

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 0 447 303 B1

(12)

FASCICULE DE BREVET EUROPEEN

(45) Date de publication et mention
de la délivrance du brevet:
04.09.1996 Bulletin 1996/36

(51) Int Cl.⁶: **C12N 15/86, C07K 14/00**

(21) Numéro de dépôt: **91400634.1**

(22) Date de dépôt: **07.03.1991**

(54) **Virus herpès recombinants notamment pour la réalisation de vaccins, leur procédé de préparation, les plasmides réalisés au cours de ce procédé et les vaccins obtenus**

Rekombinante Herpes-Viren, besonders zur Herstellung von Impfstoffen, Verfahren zur Herstellung davon, während des Prozesses hergestellte Plasmide und durchgesetzte Impfstoffe

Recombinant herpes viruses, particularly for realization of vaccines, preparation process therefor, realized plasmids during this process and obtained vaccines

(84) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL

(30) Priorité: **12.03.1990 FR 9003105**

(43) Date de publication de la demande:
18.09.1991 Bulletin 1991/38

(73) Titulaire: **RHONE MERIEUX S.A.**
69002 Lyon (FR)

(72) Inventeurs:
• **Rey-Senelonge, Arielle**
F-69140 Rillieux La Pape (FR)

• **Kohen, Gilla**
F-69140 Rillieux La Pape (FR)

(74) Mandataire: **Bernasconi, Jean et al**
c/o Cabinet Lavoix,
2, Place d'Estienne d'Orves
75441 Paris Cédex (FR)

(56) Documents cités:
WO-A-88/07088

• **J. of Virology, vol. 57, no. 3, mars 1986, pp. 802-808; M. Swain et D.A. Galloway**
• **J. of General Virology, vol. 71, no. 12, déc. 1990, pp. 2931-2939; F.J. Rixon et J. McLauchlan**

EP 0 447 303 B1

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la date de publication de la mention de la délivrance du brevet européen, toute personne peut faire opposition au brevet européen délivré, auprès de l'Office européen des brevets. L'opposition doit être formée par écrit et motivée. Elle n'est réputée formée qu'après paiement de la taxe d'opposition. (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

Description

Virus HVT recombinants notamment pour la réalisation de vaccins, leur procédé de préparation, les plasmides réalisés au cours de ce procédé et les vaccins obtenus.

La présente invention concerne des virus HVT recombinants pouvant être notamment utilisés dans des vaccins contre des maladies à virus de l'homme et des animaux, leur procédé de préparation, les plasmides réalisés au cours de ce procédé ainsi que les vaccins obtenus. Elle concerne encore une séquence nucléotidique correspondant à une partie du génome du virus herpès de la dinde (HVT) qui est susceptible d'être utilisée pour la préparation de tels virus.

Le virus herpès de la dinde (HVT) de la sous-famille des gamma-herpèsviridae est un virus naturellement apathogène et non-oncogène, relié sérologiquement au virus oncogène de la maladie de Marek, agent responsable d'une maladie lymphoproliférative des volailles, d'une importance économique considérable.

Ces deux virus possèdent de nombreuses homologues de séquence tout au long de leur génome et les données récentes publiées montrent, en outre, une similarité avec les génomes des virus herpès simplex (HSV) ou varicelle (VZV), ce qui suggère actuellement leur classification dans la famille des alpha-herpèsvirus, plutôt que celle des gamma-herpèsvirus, où ils étaient classés en raison de leur tropisme (1) (Pour les références bibliographiques, voir annexe 1).

Pendant de nombreuses années, la vaccination à l'aide du virus HVT a été très efficace pour contrôler la maladie de Marek. Néanmoins, l'émergence de nouvelles souches hautement virulentes montre la nécessité d'utiliser des vaccins plus proches antigéniquement du virus sauvage. Dans ce contexte, les vaccins obtenus par manipulation génétique sont une possibilité intéressante.

De plus en plus se développent des vecteurs viraux vivants, tels que des souches atténuées de poxvirus ou d'herpèsvirus. Ainsi, les virus HSV, ou de la maladie d'Aujeszky (PRV) ont été utilisés comme vecteurs pour l'expression de gènes étrangers (26,34). Pour cela, les gènes étrangers ont été insérés dans des fragments clonés de régions non essentielles des génomes herpès, puis introduits dans le vecteur viral par recombinaison homologue. Cette dernière étape est effectuée simplement par cotransfection, puisque les ADN des virus herpès sont naturellement infectieux.

Le virus HVT est un candidat de choix pour le développement d'un tel vecteur viral dans le domaine aviaire, puisqu'il présente le double avantage de pouvoir être utilisé pour ses propriétés vaccinales et comme vaccin d'autres maladies. De plus, ce virus entraîne une virémie permanente et peut être utilisé en embryovaccination.

Il est possible d'insérer à l'intérieur du génome HVT des gènes codant pour des immunogènes du virus de la maladie de Marek, potentialisant ainsi le rôle protecteur du virus HVT. Il est possible également d'insérer à l'intérieur du génome HVT des gènes codant pour des immunogènes d'agents pathogènes viraux, bactériens ou parasitaires d'autres maladies aviaires telles que la maladie de Marek (MDV), la bronchite infectieuse (IBV), la maladie de Newcastle (NDV), la peste aviaire, la maladie de Gumboro (IBDV), l'anémie aviaire (CAA), le syndrome chute de ponte, la coccidiose, la variole aviaire, la rhinotrachéite infectieuse, la colibacillose, la pasteurellose et l'hémophilose. Le virus HVT se présenterait alors comme une chimère multivalente.

Le matériel génétique des herpèsvirus est constitué par un ADN bicaténaire contenant 100 000 à 180 000 paires de bases. Différentes régions de ce génome ont été montrées comme étant non essentielles à la réplication virale, et sont donc des sites potentiels d'insertion de gènes étrangers, ou de délétion pour la création de nouvelles souches plus atténuées.

Certaines de ces régions sont associées à la virulence et leur modification provoque une diminution de la pathogénicité des virus. Ainsi, l'inactivation de la thymidine kinase rend l'herpès simplex humain non pathogène et n'empêche pas la croissance virale in vitro (3, 8, 21, 33); il en va de même pour le virus PRV (30). De plus, il a été montré que l'atténuation de la souche Bartha du virus PRV est liée à une délétion de la glycoprotéine gI dont le gène se trouve dans le petit fragment Us (18).

D'autres gènes des virus herpès ont été identifiés comme non essentiels à la croissance virale, sans que pour autant ils soient associés à des phénomènes de virulence. Parmi ces gènes, on peut citer le gène UL24 du virus HSV (23), différents gènes du virus HSV situés dans le petit fragment Us (35), le gène de la glycoprotéine gIII du virus (BHV) de la rhinotrachéite infectieuse bovine (9), le gène de la glycoprotéine gX du virus PRV (34).

La ribonucléotide réductase est une enzyme importante de la chaîne de biosynthèse de l'ADN, responsable de la réduction des ribonucléotides en désoxyribonucléotides. Les herpèsvirus possèdent une activité ribonucléotide réductase propre, répondant à des critères de régulation différents de ceux de l'enzyme cellulaire (12, 13). Tout comme l'enzyme bactérienne ou de mammifère, la ribonucléotide réductase des virus herpès consiste en 2 sous-unités hétérologues dont l'interaction est nécessaire à l'activité enzymatique : la grande sous-unité RR1 et la petite sous-unité RR2.

Les gènes codant pour ces protéines ont été localisés et séquencés pour le virus herpès simplex (HSV), le virus de la varicelle (VZV), le virus d'Epstein-Barr (EBV) et leur mode de transcription, étudié dans le cas du virus HSV (15, 16, 27, 28). Récemment Goldstein et Weller (1988), en insérant le gène lacZ de la bêta-galactosidase en phase dans la région terminale du gène codant pour la grande sous-unité de la ribonucléotide réductase du virus HSV ont montré le caractère non essentiel de ce gène. Des mutants délétés dans ce même gène du virus HSV ont été construits et

leur étude prouve que la ribonucléotide réductase n'est pas nécessaire à la multiplication virale dans des cellules en phase exponentielle de croissance, l'enzyme d'origine cellulaire pouvant alors compenser cette délétion (4, 5).

Néanmoins, même lorsqu'ils sont cultivés sur des cellules possédant une activité ribonucléotide réductase transcomplémentante, les mutants délétés voient leur croissance modifiée (5). Ce phénomène est considérablement amplifié lorsque ces mutants sont cultivés à 39,5°C ou sur des cellules privées de sérum (20). Plus récemment encore, il a été montré que la délétion de la grande sous-unité de la ribonucléotide réductase entraîne une diminution de la virulence du virus HSV chez la souris (7).

Il n'existe, à ce jour, aucune donnée publiée concernant le rôle essentiel de la ribonucléotide réductase du virus HVT. Aucune séquence n'existe concernant la petite sous-unité RR2 du gène de la ribonucléotide réductase du virus HVT.

Ainsi, la demande de brevet WO-A-88 07088 décrit l'introduction d'un gène d'intérêt dans une région non essentielle du virus HVT ou du virus MDV sérotypes 1 et 2. Cette demande propose de manière spécifique d'insérer dans le gène codant pour la thymidine-kinase (TK) ou dans celui codant pour la protéine A.

L'invention a donc pour objectif de fournir des virus recombinants ou virus chimères susceptibles de se multiplier de façon normale, notamment pour la réalisation de vaccins efficaces.

Le clonage et le séquençage de la partie du génome du virus herpès de la dinde (HVT) qui correspond au gène de la petite sous-unité RR2 de la ribonucléotide réductase ont d'abord été réalisés.

De façon surprenante, le gène codant pour la petite sous-unité RR2 a pu être muté ou totalement délété et remplacé par une séquence codante, sans que le mutant ainsi créé présente une altération en ce qui concerne sa croissance. Il a ainsi été démontré que le virus HVT peut être effectivement utilisé comme vecteur d'expression, en insérant un gène étranger dans le gène de la petite sous-unité RR2 et cela notamment sous le contrôle du ou des promoteurs de la petite sous-unité RR2 de la ribonucléotide réductase.

L'invention a donc pour objet la séquence nucléotidique, et ses variantes, qui correspond au gène de la petite sous-unité RR2 de la ribonucléotide réductase du virus HVT.

Cette séquence peut être associée à d'autres fragments usuels tels que promoteurs, signaux d'initiation ou d'arrêts ou introns ou autres séquences non codantes à l'extrémité 3' et/ou 5'. Elle inclut également les variantes obtenues notamment par substitution de codons ou de nucléotides conservant la signification du code, ou par substitutions, insertions ou délétions codant pour un polypeptide équivalent et notamment conservant l'antigénicité du polypeptide. Elle inclut également tout fragment permettant l'expression d'un polypeptide conservant cette antigénicité.

L'invention concerne également les différents fragments de restriction ou synthétiques, provenant de la séquence selon l'invention et notamment tout fragment capable de s'hybrider sur le gène de la petite sous-unité RR2 de HVT ou tout autre virus herpès.

L'invention a également pour objet un virus recombinant HVT comprenant un gène hétérologue inséré dans la région du génome du virus correspondant au gène de la petite sous-unité RR2 de la ribonucléotide réductase, de façon à pouvoir être exprimé. Par gène hétérologue, on entend notamment un gène codant pour une protéine ou glycoprotéine immunogène d'un agent pathogène viral, bactérien ou parasitaire. Dans le cas d'un vecteur viral constitué du virus HVT, le gène hétérologue pourra être notamment un gène codant pour un immunogène du virus de la maladie de Marek, de la bronchite infectieuse aviaire, de la maladie de Newcastle, de la peste aviaire, de la maladie de Gumboro, de l'agent de la coccidiose, de la laryngotrachéite infectieuse, de la colibacillose.

Par gène hétérologue, on entend également tout autre gène étranger au virus HVT et codant pour un peptide ou protéine, par exemple, hormones, facteurs de croissance, etc.

Le gène hétérologue inséré est exprimé de préférence sous le contrôle des séquences régulatrices de la transcription du gène de la petite sous-unité RR2. On peut cependant faire en sorte que cette expression soit sous la dépendance de séquences promotrices, provenant du virus considéré ou d'autres virus herpès, rapportées dans le génome dudit virus considéré. Le gène est placé en aval des signaux d'initiation dans un cadre de lecture correct pour son expression.

De préférence, on substitue les codons d'initiation et de terminaison du gène RR2 par ceux du gène à insérer.

L'invention a encore pour objet un procédé de préparation d'un virus HVT recombinant, dans lequel on insère le gène hétérologue dans la région, du génome de HVT, qui correspond au gène de la petite sous-unité RR2 de la ribonucléotide réductase.

De préférence, on isole la partie du génome viral enfermant le gène de la petite sous-unité RR2, on réalise, de préférence, une délétion partielle ou totale de ce gène et l'on insère le gène hétérologue dans la région correspondant audit gène avant d'introduire le fragment ADN ainsi obtenu dans le génome du virus par cotransfection et recombinaison homologue.

De préférence, on conserve les signaux d'initiation et de terminaison de transcription du gène de la petite sous-unité RR2. Cette expression peut aussi se faire sous la dépendance de séquences promotrices, provenant du virus considéré, par exemple le promoteur du gène RR1, du gène TK, du gène gA, du gène gB, ou d'autres virus herpès, par exemple le promoteur du gène gI du virus BHV ou du gène gII du virus PRV, rapportées dans le génome du virus

considéré.

Dans un mode de réalisation, un procédé de construction d'un virus recombinant peut comprendre les étapes suivantes ;

- 5 a) on isole un fragment Bam HI K1 du génome de HVT par digestion du génome par l'enzyme de restriction Bam HI,
- b) on digère ce fragment par l'enzyme de restriction Hind III, pour obtenir un fragment correspondant à la partie 5' du gène RR2 et à la région en amont incluant le promoteur et un fragment correspondant à la partie 3' du gène RR2 et à la région en aval de ce gène,
- c) on clone les deux fragments ainsi obtenus en b) respectivement dans les vecteurs pUC 18 et pUC 19,
- 10 d) on digère ces plasmides respectivement par les couples d'enzymes de restriction Hind III - Aat II et Xmn I - Aat II pour générer un nouveau plasmide comportant une délétion entre les sites Hind III et Xmn I,
- e) on crée par mutagenèse dirigée des sites de restriction dans le plasmide obtenu en d), permettant l'insertion correcte du gène à exprimer,
- f) on clone dans ces sites de restriction un gène hétérologue, notamment un gène codant pour un immunogène associé à une maladie aviaire, et
- 15 g) on insère le fragment d'ADN obtenu en f) dans le génome du virus HVT par cotransfection et recombinaison homologue.

L'invention a encore pour objet un virus recombinant obtenu par le procédé selon l'invention.

- 20 L'invention a encore pour objet un plasmide comportant une partie du génome, du virus HVT, qui renferme le gène de la petite sous-unité RR2.

De préférence, la partie de génome contenu dans le plasmide comprend une délétion dans la région correspondant au gène de la petite sous-unité RR2. De préférence encore, un gène hétérologue, par exemple un gène codant pour un immunogène, est inséré dans ladite région correspondant au gène de la petite sous-unité RR2.

- 25 L'invention a encore pour objet un plasmide comportant le fragment Bam HI K1, du virus HVT, renfermant le gène de la petite sous-unité RR2 de la ribonucléotide réductase. De préférence, ce fragment comprend une délétion de 766 bases entre les sites initiaux Hind III et Xmn I. De préférence encore un gène hétérologue codant pour un immunogène de maladie aviaire est inséré dans la région, de ce fragment, qui correspond au gène de la petite sous-unité RR2 de la ribonucléotide réductase.

- 30 L'invention a encore pour objet des virus recombinants HVT comprenant le fragment de génome recombiné du plasmide réalisé à partir du génome dudit virus.

L'invention a encore pour objet un vaccin comprenant un virus recombinant obtenu comme précédemment. Les excipients et diluants seront notamment ceux utilisés habituellement pour la préparation de tels vaccins, notamment des vaccins vivants concernés.

- 35 L'invention va être maintenant décrite plus en détail. On va d'abord décrire le clonage et le séquençage du gène de la petite sous-unité RR2 de la ribonucléotide réductase du virus HVT, puis l'introduction d'une délétion dans le gène de la petite sous-unité de HVT et la démonstration du caractère non essentiel de cette petite sous-unité dans la multiplication virale. On verra ensuite l'insertion de gènes hétérologues dans le vecteur viral et leur expression.

La description détaillée sera faite en référence au dessin annexé dans lequel :

- 40 la figure 1 représente la carte de restriction du génome du virus HVT et la localisation du gène RR2 ;
- la figure 2 représente un schéma expliquant l'introduction d'une délétion dans la petite sous-unité RR2 de la ribonucléotide réductase ;
- la figure 3 représente un schéma expliquant la création de sites de clonage par mutagenèse dirigée dans le gène
- 45 délété de la petite sous-unité RR2 ;
- la figure 4 représente un schéma expliquant l'insertion du gène LacZ à la place du gène codant pour la petite sous-unité RR2 de la ribonucléotide réductase ;
- la figure 5 représente un schéma expliquant l'introduction d'un "polylinker" à la place du gène RR2 ; et
- 50 la figure 6 représente un schéma expliquant l'insertion de l'ADNc du gène de la protéine fusion du virus de la maladie de Newcastle.

MATERIEL ET METHODES

- De manière générale, les techniques utilisées pour la construction des plasmides recombinants sont celles décrites
- 55 par T. Maniatis et al. (17). Pour toutes les étapes de clonage ou de sous-clonage, le vecteur linéarisé par les enzymes de restriction appropriées est déphosphorylé avant ligation.

La purification des fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose est faite selon la technique décrite par le fabricant : "GeneClean" (Bio 101, San Diego, Californie, USA).

Souche virale

La souche FC 126 du virus HVT a été isolée en 1968 par le Dr. Witter du Regional Poultry Research Laboratory (USDA, East Lansing, Michigan, USA), dans un troupeau de dindes de 23 semaines (36).

Elle a été ensuite passée 10 fois sur des fibroblastes de canard, puis a subi 9 passages supplémentaires sur des fibroblastes d'embryons de poulets EOPS.

L'ADN viral utilisé pour ce travail a été extrait à partir de virus ayant fait l'objet au total de 23 à 24 passages à partir de l'isolat d'origine.

Culture cellulaire

Les fibroblastes d'embryons de poulets sont cultivés en milieu F10-199 (Rhône-Mérieux, Lyon, France) supplémenté de sérum de veau foetal.

Les cellules destinées à produire le virus utilisé pour purifier l'ADN ont été cultivées en flacons roulants.

Pour les expériences de transfection, les cellules ont été cultivées en boîtes de Pétri de 10 cm ou sur des boîtes à 24 puits.

Isolément d'ADN du virus HVT pour le clonage

Les monocouches confluentes de fibroblastes de poulet sont infectées par le virus HVT et laissées en incubation pendant 1 à 3 jours à $39^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Lorsque l'effet cytopathique dû au virus est jugé optimum, les cellules infectées sont décollées des parois des flacons roulants puis centrifugées. Les culots de cellules infectées sont remis en suspension dans un stabilisateur contenant du saccharose et de l'albumine bovine. La suspension cellulaire ainsi préparée est plongée dans un bain-marie glacé, puis traitée aux ultrasons. La suspension est ensuite clarifiée par centrifugation à basse vitesse et centrifugée 1 h à 40 000 tr/mn avec un rotor Ti 45 (Beckmann, Palo Alto, Californie, USA).

Le culot viral, repris en tampon (Tris 10 mM; NaCl 136 mM; KCl 2,6 mM; MgCl_2 20 mM; CaCl_2 1,8 mM) et purifié par centrifugation sur gradient zonal de saccharose (30 %, 50 % p/v) pendant 20 h à 23 000 tr/mn avec un rotor SW28 (Beckmann). Le virus obtenu dans la fraction correspondant à une densité de saccharose correspondant à une concentration d'environ 48 % est récupéré. Après dilution en tampon Tris 50 mM EDTA 10 mM, le virus est sédimenté par centrifugation pendant 40 mn à 40 000 tr/mn avec un rotor SW41 (Beckmann). L'ADN viral est alors extrait en traitant le virus purifié par la protéinase K à raison de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pendant 2 h à 37°C en présence de SDS à 0,5 %, puis purifié par un traitement au phénol suivi de 3 traitements au chloroforme-alcool isoamylique (24:1). L'ADN viral est ensuite précipité par de l'éthanol à -20°C .

Isolément d'ADN infectieux pour les expériences de transfection.

Le virus HVT associé aux cellules est inoculé à des monocouches confluentes de fibroblastes de poulets à une multiplicité d'infection d'environ 0,001 ufp (unité formatrice de plaques) par cellule.

Les cellules infectées sont incubées à 37°C en milieu F10-199 supplémenté avec 2 % de sérum de veau foetal.

Lorsque l'effet cytopathique est maximum (2 à 3 jours), le milieu est éliminé et les cellules infectées sont récoltées après trypsination, puis sédimentées par centrifugation à basse vitesse.

Le culot renfermant les cellules infectées est repris en tampon Tris 10 mM - EDTA 1 mM, pH 8, renfermant 0,5 % (p,v) de Triton X100 et 0,5 % (p,v) de NP40 à raison de $2 \cdot 10^8$ cellules infectées par ml de tampon et traitées comme décrit par Lee et coll, 1980 (14).

Le virus est ensuite obtenu par centrifugation sur gradient de saccharose 15 % - 30 % (p/v) pendant 24 mn à 22 000 tr/mn comme indiqué par Lee et coll.

L'ADN viral est extrait des virus purifiés par traitement à la protéinase K (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ final) et SDS 0,5 % (p,v) pendant 1 nuit à 37°C , puis purifié par centrifugation zonale sur gradient de glycérol 10 % - 30 % (v,v), pendant 4 h 30 à 38 000 tr/mn avec un rotor SW41.

L'ADN viral est ensuite précipité par l'alcool et repris en tampon Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5.

Clonage de l'ADN

L'ADN viral a été digéré par l'enzyme de restriction Bam HI et les fragments ont été clonés dans le plasmide pUC 18 (38) digéré préalablement par Bam HI et déphosphorylé.

Les bactéries E. coli NM 522 (6) ont été transformées selon la procédure au chlorure de calcium, puis cultivées en présence d'ampicilline et d'Xgal.

Les colonies blanches ont été cultivées en petits volumes et l'ADN plasmidique a été extrait.

Les clones ont été sélectionnés en fonction de la taille des inserts déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 % après digestion par Bam HI.

Séquençage.

Les séquences nucléotidiques ont été déterminées selon la technique des didésoxynucléotides décrite par Sanger, 1977 (24), à l'aide du kit Sequanase version 2 (USB, Cleveland, Ohio, USA) selon le protocole décrit par le fabricant (29), en utilisant des oligonucléotides synthétiques spécifiques (Applied Biosystems, Forster City, Californie, USA).

Mutagenèse dirigée.

- Les fragments d'ADN clonés dans le phage M13 ont été mutagénisés selon la technique décrite par le fabricant du kit de mutagenèse in vitro (Amersham, Buckinghamshire, Grande-Bretagne) (19, 31, 32).
- Les fragments d'ADN clonés dans le vecteur Blue Script SK+ (Stratagene, La Jolla, Californie, USA) ont été mutagénisés après séparation des ADN simple brin à l'aide du phage helper R408 (Stratagene, La Jolla, USA) (22). La procédure de mutagenèse et de sélection des mutants en utilisant la souche CJ236 dut ung⁻ d'E. coli (In Vitrogen, San Diego, Californie, USA), a été décrite par T. Kunkel et al. (10,11).

Transfection.

Les cellules primaires d'embryons de poulets cultivées jusqu'à confluence (24 h) ont été cotransfectées par l'ADN viral HVT et l'ADN d'un plasmide renfermant le gène à insérer, flanqué en 5' et 3' de régions du génome HVT de façon à permettre la recombinaison homologue.

La technique utilisée est celle de la Lipofectine® décrite par le fabricant (BRL, Bethesda Research Laboratory, Gaithersburg, Madison, USA) (2).

1 µg d'ADN viral a été mélangé avec 1 à 10 µg d'ADN du plasmide linéarisé, sous un volume de 50 µl, puis ajouté à 50 µl de réactif Lipofectine.

L'ensemble a été laissé 30 mn à température ambiante, puis ajouté aux cellules préalablement rincées par du milieu sans sérum. L'adsorption a été réalisée pendant 5 h à 37°C sous ambiance CO₂ en présence de 3 ml de milieu sans sérum (optimum de BRL). Après 5 h, du sérum de veau foetal a été ajouté à 8 % final et la culture a été poursuivie pendant 72 h ou plus.

Les premières figures d'effet cytopathogène sont apparues au bout de 72 h.

Les cellules ont parfois été trypsinées après 72 h, puis réinoculées (1:1 ou 1:2) en un passage secondaire, en milieu F10-199, et incubées à 37°C jusqu'à apparition des plages de lyse (72 h au minimum), cela pour augmenter l'effet cytopathogène.

200 plages en moyenne par µg d'ADN HVT ont été obtenues.

Après apparition des foyers viraux, le milieu est éliminé puis remplacé par du milieu F10-199 supplémenté par 2 % de sérum de veau foetal et renfermant 1 % d'agarose.

Les cellules infectées ont été récupérées par carottage, dissociées par addition d'une goutte de solution de trypsine (0,4 %) et inoculées à une culture cellulaire.

EXEMPLE 1.

CLONAGE DU GENE DE LA RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE ET DETERMINATION DE SA SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE

Il a été montré par Buckmaster et coll. que le gène de la grande sous-unité de la ribonucléotide réductase du virus HVT pouvait être localisée soit au niveau du fragment de restriction Bam HI K1, soit au niveau du fragment Bam HI K2 (1).

Les plasmides pUC 18 renfermant un insert d'une taille correspondant à celle du fragment K1/K2 (soit 4,2 kilobases) décrits ci-dessus (clonage de l'ADN), ont donc été sélectionnés, puis les extrémités des inserts séquencées. Les séquences obtenues ont été comparées, à l'aide d'un programme d'analyse de séquences Microgenie (Beckmann), aux séquences publiées de la ribonucléotide réductase des virus VZV, HSV, EBV. L'homologie de séquence a permis de retenir le plasmide pHVT K1. Ce plasmide contient la totalité du gène de la petite sous-unité RR2 de la ribonucléotide réductase et la région 3' du gène de la grande sous-unité RR1.

La séquence du gène de la ribonucléotide réductase est repérée SEQ ID NO : 1 dans la liste des séquences annexée (annexe 2). La phase de lecture correspondant au gène de la petite sous-unité RR2 commence à la position 1965 et se termine à la position 2759.

La séquence RR2 obtenue présente une homologie de 54 % au niveau nucléotides avec la séquence correspondante du virus VZV. Cette homologie n'est plus que de 30 % avec le virus EBV, ce qui montre à nouveau une plus grande homologie des séquences du virus HVT avec celles des alpha-herpèsvirus.

5 EXEMPLE 2.

INSERTION DU GENE Lac Z DANS LE VECTEUR HVT

La possibilité d'utiliser le gène de la petite sous-unité de la ribonucléotide réductase comme site d'insertion de gènes étrangers peut être démontrée en lui substituant tout d'abord un gène marqueur, par exemple le gène lacZ de la bêta-galactosidase.

Si le site est bien non essentiel, le virus mutant HVT Lac RR2 \ominus après recombinaison in vivo donnera en présence d'Xgal une coloration bleue.

15 1 - Construction d'un plasmide pHVT002 renfermant le gène lacZ à la place du gène de la petite sous-unité de la ribonucléotide réductase.

Ce plasmide a été construit en 3 étapes :

- 20 - introduction d'une délétion dans le gène de la petite sous-unité de la ribonucléotide réductase : plasmide pHVT 001 ;
- création de sites de restriction par mutagenèse dirigée pour le clonage du gène hétérologue ;
- insertion du gène lacZ de la bêta-galactosidase : plasmide pHVT 002.

25 1.1 - Construction du plasmide pHVT001 (figure 2).

Le plasmide pHVT K1, qui renferme le fragment de restriction BamHI K1, a été digéré par BamHI. Ce fragment de 4,2 kilobases a été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose. Il a ensuite été digéré par HindIII.

Le fragment BamHI-HindIII de 1374 paires de bases a été sous-cloné dans le vecteur pUC18 préalablement linéarisé pour donner le plasmide p18HVT RR1.

Le fragment HindIII-BamHI de 2826 paires de bases a été sous-cloné dans le vecteur pUC19 (38) préalablement linéarisé pour donner le plasmide p19HVT RR2.

Le plasmide p18HVT RR1 a été digéré par HindIII. Les extrémités de l'ADN ainsi linéarisé ont été remplies grâce à l'ADN polymérase (fragment Klenow). Une deuxième digestion par l'enzyme AatII a ensuite été réalisée. Le fragment de 3578 paires de bases ayant une extrémité franche et l'autre extrémité correspondant au site AatII a été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose.

Le plasmide p19HVT RR2 a été digéré par l'enzyme de restriction XmnI, puis par l'enzyme de restriction AatII. Le fragment de restriction de 2700 paires de bases AatII-XmnI, après purification sur gel d'agarose, a été ligué avec le fragment de 3578 paires de bases décrit au paragraphe précédent pour donner le plasmide pHVT001. Ce plasmide comporte une délétion de 766 paires de bases entre les sites initiaux HindIII et XmnI.

1.2 Création de sites de clonage par mutagenèse dirigée (figure 3)

Le fragment de restriction BamHI de 3440 paires de bases issu du plasmide pHVT001 a été purifié par électrophorèse, puis digéré par EcoRI. Les 2 fragments BamHI- EcoRI de respectivement 1340 paires de bases et 2100 paires de bases environ ont été clonés dans le phage M13mp19 (38). Les clones obtenus sont respectivement nommés mp19 RR1 et mp19 RR2 \ominus .

Un site SmaI a été créé par mutagenèse dirigée dans le phage mp19 RR1, en 3' de l'ATG, à l'aide de l'oligonucléotide désigné par SEQ ID NO : 3 dans la liste des séquences annexée.

Le phage ainsi obtenu est dénommé : mp19 RR1 Sma.

Un site SalI a été introduit dans le phage mp19 RR2 \ominus en 5' du signal de polyadénylation du gène de la petite sous-unité à l'aide de l'oligonucléotide désigné par SEQ ID NO : 4.

Le phage ainsi obtenu est dénommé mp19 RR2 \ominus Sal.

55 1.3 Création du plasmide pHVT002 (figure 4).

Le fragment muté BamHI-EcoRI de 1340 paires de bases contenu dans le vecteur mp19 RR1Sma, tel que décrit à la figure 3, a été purifié par électrophorèse après digestion par PstI et SmaI. Il a ensuite été cloné dans le vecteur

pMC1871 (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suède) (25) entre les sites PstI et SmaI, pour donner le plasmide pMC1871 RR1. Ce plasmide renferme les 1000 bases 3' terminales du gène de la grande sous-unité RR1 de la ribonucléotide réductase et le gène Lac Z en phase avec l'ATG de la petite sous-unité RR2.

Le fragment muté BamHI-EcoRI d'environ 2100 paires de bases provenant du phage mp19 RR2 \ominus Sal tel que décrit à la figure 3, a été cloné dans le vecteur pBR322 (37) entre les sites BamHI et Sall pour donner le plasmide pBR RR2 \ominus . Les deux nouveaux plasmides pMC1871 RR1 et pBR RR2 \ominus ont été digérés par XmaIII et Sall.

Le fragment XmaIII-Sall de 3665 paires de bases isolé à partir du plasmide pMC1871 RR1 a été purifié par électrophorèse. De la même façon, le fragment XmaIII-Sall de 6200 paires de bases environ isolé à partir du plasmide pBR RR2 \ominus a été purifié. Ces deux fragments ont ensuite été ligués pour donner le plasmide pHVT002.

Ce plasmide renferme donc les 200 paires de bases de la partie 3' du gène RR1, les 33 paires de bases non codantes jusqu'à l'ATG du gène RR2, puis le gène Lac Z inséré en phase, et enfin la région 3' non codante du gène RR2.

2. Obtention d'un virus HVT muté RR2 \ominus Lac Z

Des cellules primaires d'embryons de poulet ont été cotransfectées avec 1 à 10 μ g de plasmide pHVT002 et 1 μ g d'ADN génomique HVT infectieux selon la technique de la Lipofectine. Après 72 à 96 h de culture à 37°C sous ambiance CO₂, de nombreuses figures d'effet cytopathique sont observées. Le milieu a alors été éliminé et remplacé par une surcouche d'agarose à 1 % en milieu F10-199 renfermant 0,5 % d'Xgal. La culture a été poursuivie pendant 24 h. Au bout de 4 à 5 h, des plages bleues nettement identifiées ont été obtenues.

Les cellules ont alors été prélevées par carottage et le tapis cellulaire restant au fond du puits a été repris par addition d'une goutte de trypsine. L'ensemble a été inoculé à des cellules saines. Un effet cytopathique a été observé après 72 à 96 h. Après addition d'Xgal, les cellules infectées présentent des lésions du tapis cellulaire colorées en bleu.

EXEMPLE 3

INSERTION DU GÈNE FUSION DU VIRUS DE LA MALADIE DE NEWCASTLE

L'insertion du gène fusion de la maladie de Newcastle a été réalisée en deux étapes.

- 1) Construction du plasmide pHVT003 comprenant la délétion du gène RR2 et l'insertion de plusieurs sites de clonage.
- 2) Construction du plasmide pHVT004 contenant le gène fusion à la place du gène RR2.

1. Construction du plasmide pHVT003 (figure 5)

Le phage recombinant muté mp19 RR1Sma décrit à la figure 3 a été digéré par SmaI et BamHI

Le fragment libéré de 1110 paires de bases, qui contient une partie du gène RR1 et le codon ATG du gène RR2, a été cloné dans le vecteur Blue Script SK+ au niveau des sites de restriction SmaI et BamHI pour donner le plasmide pSK+RR1. Par mutagenèse dirigée, un site de restriction NcoI a été introduit au niveau du signal ATG à l'aide de l'oligonucléotide SEQ ID NO : 5, générant ainsi le plasmide pSK+ RR1Nco.

Le phage recombinant muté, mp19 RR2 \ominus Sal, décrit figure 3, a été digéré par BamHI et Sall. Le fragment libéré de 2,1 kilobases environ a été cloné dans le vecteur M13mp18 au niveau des sites de restriction BamHI et Sall. Le clone obtenu a été appelé mp18 RR2-Sal.

Le fragment de 2,1 kilobases environ a été libéré du phage mp18 RR2-Sal par digestion par KpnI et Sall, puis introduit au niveau de ces sites dans le plasmide pSK+ RR1Nco, linéarisé par les enzymes KpnI et Sall. Un plasmide pHVT003 a ainsi été construit. Il renferme une partie du gène RR1, la région 3' non codante de ce gène, le codon ATG du gène RR2, une séquence comprenant plusieurs sites de restriction uniques et enfin la région 3' non codante du gène RR2.

2. Construction du plasmide pHVT004 qui renferme le gène fusion du virus de la maladie de Newcastle, inséré à la place du gène RR2.

L'ADNc du gène fusion a été cloné dans le vecteur pBR322 au site Scal, ce qui correspond au plasmide pNDV108. La séquence du gène fusion est donnée en annexe : SEQ ID NO : 2

Le plasmide pNDV108 a été digéré par BstEII, les extrémités remplies par l'ADN polymérase (fragment Klenow) puis par SphI. L'insert de 1786 paires de bases ainsi libéré a été cloné dans le phage M13mp19 linéarisé par SmaI et SphI pour donner le phage mp19 F5. Ce phage est ensuite mutagénisé à l'aide de l'oligonucléotide SEQ ID NO : 6, pour donner le phage muté mp19 F5Nco.

Le phage mp19 F5Nco a été digéré par AccI et NcoI, et le fragment de 852 paires de bases ainsi obtenu a été cloné dans le vecteur pHTV003 linéarisé par NcoI et SmaI pour donner le plasmide pHTV003 F5Nco.

Ce plasmide insère donc la région 3' terminale du gène RR1, les 33 bases non codantes en 3' de ce gène, puis 852 bases du gène fusion inséré en phase, une séquence "polylinker" et enfin la région non codante située en 3' du gène RR2.

Le plasmide pNDV108 a été digéré par PstI et BamHI. Le fragment de 1765 paires de bases obtenu a été cloné dans le phage M13mp19 linéarisé par PstI et BamHI pour donner la phage mp19 F3, puis mutagénisé à l'aide de l'oligonucléotide SEQ ID NO : 7, pour donner le phage mp19 F5EcoRV. Ce phage a été digéré par PstI et EcoRV, et le fragment de 1567 paires de bases ainsi libéré a été cloné dans le plasmide pHTV003 F5Nco, linéarisé par PstI et EcoRV, pour donner le plasmide pHTV004.

Ce plasmide contient la région 3' du gène RR1, les 33 bases non codantes en 3' de ce gène, puis le gène fusion du virus de la maladie de Newcastle inséré en phase, et enfin la région 3' non codante du gène RR2.

INSERTION DU GENE FUSION DANS LE VIRUS VECTEUR HVT

Le plasmide pHTV004 a été utilisé dans des expériences de cotransfection de cellules de fibroblastes d'embryons de poulet avec l'ADN infectieux du virus HVT. On peut ainsi obtenir un virus recombinant HVT exprimant le gène fusion du virus de la maladie de Newcastle.

La petite sous-unité de la ribonucléotide réductase peut donc être utilisée pour insérer des gènes dans le génome du virus HVT et les promoteurs de la ribonucléotide réductase sont efficaces pour permettre leur expression.

On peut ainsi insérer des gènes codant pour des immunogènes associés à la maladie de Marek, à la bronchite infectieuse aviaire, à la maladie de Newcastle, à la peste aviaire, à la maladie de Gumboro, à la coccidiose, à la rhinotrachéite infectieuse, à la colibacillose.

Les virus recombinants ainsi obtenus pourront être utilisés comme vecteurs d'expression du gène inséré, dans des vaccins dits vaccins chimères. Le virémie permanente dont est responsable le virus HVT doit permettre une bonne dissémination des immunogènes exprimés et ainsi provoquer la réponse immunitaire souhaitée.

Bien entendu, les virus recombinants selon l'invention peuvent comporter ensuite, en plus du ou des gènes insérés dans le gène de la petite sous-unité RR2, un ou plusieurs gènes insérés en d'autres endroits du génome, par exemple dans la grande sous-unité RR1 ou dans le gène codant pour la thymidine kinase.

ANNEXE 1 : INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. A.E. BUCKMASTER, S.D. SCOTT, M.J. SANDERSEN, M.E.G. BOURSNEILL, L.J.N. ROSS, M.H. BINNS (1988) J. Gen. Virol., 69, 2033-2042

2. P.L. FELGNER, T.R. GADEK, M. HOLM, R. ROMAN, H.W. CHAN, M. WENZ, J.P. NORTHROP, G.M. RINGOLD and M. DANIELSEN (1987) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413

3. H. FIELD, P. WILDY (1987) J. Hygiene (Cambridge), 81, 267-277

4. D.J. GOLDSTEIN, S.K. WELLER (1988) J. Virol., 62, 196-205

5. D.J. GOLDSTEIN, S.K. WELLER (1988) Virology, 166, 41-51

6. J. GOUGH et N. MURRAY (1983) J. Mol. Biol., 166, 1-19

7. J.G. JACOBSON, D.A. LEIB, D.J. GOLDSTEIN, C.L. BOGART, P.A. SCHAFER, S.K. WELLER, D.M. COEN (1989) Virology, 173 (1), 276-283

8. A.T. JAMIESON et al. (1974) J. Gen. Virol., 24, 465-480

9. EP-A-O 316 658

10. T. KUNKEL (1985) Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 488-492

11. T. KUNKEL, J. ROBERTS, B. ZAKOUR (1987) In Methods in Enzymology, 154, 367-382 Acad. Press

12. Y. LANGELIER, G. BUTTIN (1981) J. Gen. Virol., 57, 21-31

13. H. LANKINEN, A. GAASLUND, L. THELANDER (1982) J. Virol., 41, 893-900
14. LEE et al. (1980) J. Gen. Virol., 51, 245-253
- 5 15. J. McLAUCHLAN, J.B. CLEMENTS (1983) The Embo Journal, 2, (11), 1953-1961
16. J. McLAUCHLAN, J.B. CLEMENTS (1983) J. Gen. Virol., 64, 997-1006
17. T. MANIATIS, E.F. FRITSCH, J. SAMBROOK (1982) "Molecular cloning: A laboratory manual" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 10 18. C.T. METTENLEITER, C. SCHREURS, F. ZUCKERMANN, T. BEN PORAT (1987) J. Virol., 61, 4030-4032
19. K. NAKAMAYE and F. ECKSTEIN (1985) Nucleic Acid Res., 13, 9679-9698
- 15 20. V.G. PRESTON, A.J. DARLING, I.M. McDUGALL (1988) Virology, 167, 458-467
21. B. ROIZMAN et al. (1983) Cold Spring Harbor Conference on New Approaches to Viral Vaccines, September 1983
- 20 22. M. RUSSEL, S. KIDD, M. KELLEY (1986) Gene, 45, 333-338
23. P.J. SANDERS (1982) J. Gen. Virol., 63, 277-295
- 25 24. F. SANGER, S. NICKLEN, A.R. COULSON (1977) Proc. Natl. Acad., USA, 74, 5463-5467
25. S.K. SHAPIRA et al. (1983) Gene, 25, 71-82
26. M.F. SHIH, M. ARSENAKIS, P. THIOLLAIS, B. ROIZMAN (1984) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5867-5870
- 30 27. S. SIMPSON, J. McLAUCHLAN, J.B. CLEMENTS (1989) 14th International Herpesvirus Workshop, Nyborgstrand, Denmark (1989)
28. M.A. SWAIN, D.A. GALLOWAY (1986) J. Virol., 57, (3), 802-808
- 35 29. S. TABOR and C.C. RICHARDSON (1987) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, N°14, 4767-4771
30. G. TATAROV (1968) Zentralbl. Vet. Med., 15B, 848-853
- 40 31. J.W. TAYLOR et al. (1985) Nucleic Acid Res., 13, 8749-8765
32. J.W. TAYLOR, J. OTT, F. ECKSTEIN (1985) Nucleic Acid Res., 13, 8764-8785
33. R.L. THOMPSON, E.K. WAGNER, J.G. STEVENS (1983) Virology, 131, 180-192
- 45 34. D.R. THOMSEN, C.C. MARCHIOLI, R.J. YANCEY (1987) J. Virol., 61, 229-232
35. P.C. WEBER (1987) Science, 236, 576-579
- 50 36. R.L. WITTER et al. (1970) Am. J. Vet. Res., 31, 525-538
37. BOLIVAR F. et al., Gene 1977, 2, 95-113 38. YANNISCH-PERRON C. et al., Gene 1985, 33, 103-119.

ANNEXE 2 : LISTE DES SEQUENCES

SEQ ID NO:1

Longueur de la séquence : 3 278 paires de bases

Type de molécule séquencée :

ADN génomique

Origine de la molécule :

Virus herpès de la dindé (HVT) souche FC 126

5 Source expérimentale :

Plasmide pHVT K1

Caractéristiques :

10 de 1 à 1 662 paires de bases : gène RR1
de 1 663 à 1 694 paires de bases : région non codante
de 1 695 à 2 759 paires de bases : gène RR2
de 2 760 à 3 278 paires de bases : région non codante

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 0 447 303 B1

	GAT	CCA	AGA	ACT	ACA	ACC	ACC	CAA	GAT	ACT	ATC	AAA	GTT	ATA	ACG	45
	Asp	Pro	Arg	Thr	Thr	Thr	Thr	Gln	Asp	Thr	Ile	Lys	Val	Ile	Thr	15
5	AAT	GAT	GTT	GTT	CCC	CAT	CTC	CTG	GCA	CGA	GGA	GGG	ATA	GGC	ATA	90
	Asn	Asp	Val	Val	Pro	His	Leu	Leu	Ala	Arg	Gly	Gly	Ile	Gly	Ile	30
	TCA	TTG	CAG	CAC	GTC	AAT	CAA	AAA	TGG	GGT	CTG	ATG	CAT	GTT	TTA	135
	Ser	Leu	Gln	His	Val	Asn	Gln	Lys	Ser	Gly	Leu	Met	His	Val	Leu	45
10	AAG	CTG	ATA	GAT	TCA	TTG	ATT	GTC	GCC	ACT	AAT	GTC	AAC	GAG	TCC	180
	Lys	Leu	Ile	Asp	Ser	Leu	Ile	Val	Ala	Thr	Asn	Val	Asn	Glu	Ser	60
	CGG	CCG	ACG	GGC	GTT	TGT	GTC	TAT	TTG	GAA	CCC	TGG	CAT	TCA	GAC	225
	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Cys	Val	Tyr	Leu	Glu	Pro	Trp	His	Ser	Asp	75
15	ATC	ATG	TGG	GCT	TTG	ACG	ATG	CGC	GGA	ATG	ATG	GCC	GCC	GAG	GAA	270
	Ile	Met	Ser	Ala	Leu	Thr	Met	Arg	Gly	Met	Met	Ala	Ala	Glu	Glu	90
	TCG	AGA	AGA	TGT	GAT	AAT	GTA	TTC	CTA	GCT	CTT	TGG	GCG	TGC	GAC	315
	Ser	Arg	Arg	Cys	Asp	Asn	Val	Phe	Leu	Ala	Leu	Trp	Ala	Cys	Asp	105
20	CTC	CTG	TTT	AAG	AGA	TAC	CTG	CGA	TAT	GTT	AAT	GGA	GAA	AAA	AAT	360
	Leu	Leu	Phe	Lys	Arg	Tyr	Leu	Arg	Tyr	Val	Asn	Gly	Glu	Lys	Asn	120
	GTG	ATG	TGG	ACT	TTA	TTT	GAC	TCC	CGC	GCG	TCT	ATT	TTA	TCA	AAA	405
	Val	Met	Trp	Thr	Leu	Phe	Asp	Ser	Arg	Ala	Ser	Ile	Leu	Ser	Lys	135
25	CTA	TAT	GGC	GAT	AAA	TTC	GAG	GTC	GAA	TAT	GAA	CGT	CTC	GAA	AAA	450
	Leu	Tyr	Gly	Asp	Lys	Phe	Glu	Val	Glu	Tyr	Glu	Arg	Leu	Glu	Lys	150
	GAA	GGT	ATT	GGG	GTC	GCC	CAA	ATT	CCA	ATC	AGA	GAC	ATG	ATG	TTT	495
	Glu	Gly	Ile	Gly	Val	Ala	Gln	Ile	Pro	Ile	Arg	Asp	Met	Met	Phe	165
30	GCG	ATC	ATA	AAA	AGC	GCA	GCT	TCT	ACT	GGA	AGT	CCA	TTC	ATT	CTC	540
	Ala	Ile	Ile	Lys	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Gly	Ser	Pro	Phe	Ile	Leu	180
	TTC	AAA	GAC	GCC	TGC	AAC	CGA	CAT	TAC	ATC	ACG	GAC	ACC	CAG	GGC	585
	Phe	Lys	Asp	Ala	Cys	Asn	Arg	His	Tyr	Ile	Thr	Asp	Thr	Gln	Gly	195
35	GAT	GCT	ATT	GCG	GGA	TCC	AAT	CTG	TGC	ACA	GAA	ATA	ATA	CAG	AAA	630
	Asp	Ala	Ile	Ala	Gly	Ser	Asn	Leu	Cys	Thr	Glu	Ile	Ile	Gln	Lys	210
	ACA	AAC	GAA	TCC	ACA	AAT	GSC	GTC	TGC	ACC	CTA	GCA	AGC	ATT	AAT	675
	Thr	Asn	Glu	Ser	Thr	Asn	Gly	Val	Cys	Thr	Leu	Ala	Ser	Ile	Asn	225
40	CTG	GCC	AGA	TGC	GTT	CGC	CGT	GTT	AAC	GTC	AAT	GTA	AAT	TGG	ATT	720
	Leu	Ala	Arg	Cys	Val	Arg	Arg	Val	Asn	Val	Asn	Val	Asn	Ser	Ile	240
	TTG	ATG	CCC	TTA	GSC	ATG	CCG	TTT	CGA	CTG	GCC	ACC	GTT	TTT	ACC	765
	Leu	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Pro	Phe	Arg	Leu	Ala	Thr	Val	Phe	Thr	255
45	AAT	GCA	ATA	ATG	GAT	GGG	AGT	GAT	GTC	CCC	ACA	GTC	AAA	TCT	CAA	810
	Asn	Ala	Ile	Met	Asp	Gly	Ser	Asp	Val	Pro	Thr	Val	Lys	Ser	Gln	270
	TCG	GST	CGA	GAC	CGC	AAC	AGA	TCT	ATT	GGT	ATA	GSC	GTC	CAA	GGA	855
	Ser	Gly	Arg	Asp	Arg	Asn	Arg	Ser	Ile	Gly	Ile	Gly	Val	Gln	Gly	285
50	TTT	CAT	ACA	GCC	ATG	CTA	TCT	TTG	GGT	CTA	GAT	TTA	GAG	GAC	GGA	900
	Phe	His	Thr	Ala	Met	Leu	Ser	Leu	Gly	Leu	Asp	Leu	Glu	Asp	Gly	300
	GCT	GTC	AGA	GCA	CTT	AAT	AAG	CAA	ATA	TTT	GAA	CTA	ATG	CTA	TTA	945
	Ala	Val	Arg	Ala	Leu	Asn	Lys	Gln	Ile	Phe	Glu	Leu	Met	Leu	Leu	315
55	GAA	GCT	ATG	ACC	GTC	AGC	TGC	GAA	TTT	TGT	GAG	CGG	GST	CTT	CCA	990

EP 0 447 303 B1

	Glu	Ala	Met	Thr	Val	Ser	Cys	Glu	Phe	Cys	Glu	Arg	Gly	Leu	Pro	330	
	CCG	TTC	CCA	GAC	TTC	TCT	GAC	AGC	TAC	TAT	GCT	CAA	GGC	CGT	TTG	1035	
5	Pro	Phe	Pro	Asp	Phe	Ser	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Gln	Gly	Arg	Leu	345	
	CAT	TTT	GAT	GGA	TGG	GAT	AGT	GTG	GAG	TTA	ACG	GCC	CCC	GAG	GAA	1080	
	His	Phe	Asp	Gly	Trp	Asp	Ser	Val	Glu	Leu	Thr	Ala	Pro	Glu	Glu	360	
	TGG	GGA	GTT	CTC	CGC	GGT	CGT	ATA	ATG	TCG	TCT	GGG	CTT	TAC	AAC	1125	
10	Trp	Gly	Val	Leu	Arg	Gly	Arg	Ile	Met	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Asn	375	
	GCC	CAG	TTC	ATA	GCG	CTG	ATG	CCT	ACT	GCC	GCA	TCG	GCG	CAA	GTG	1170	
	Ala	Gln	Phe	Ile	Ala	Leu	Met	Pro	Thr	Ala	Ala	Ser	Ala	Gln	Val	390	
	ACC	GAG	GTT	AGC	GAA	GGA	TTT	GCC	CCT	TTG	TTC	AGT	AAC	ATG	TTC	1215	
15	Thr	Glu	Val	Ser	Glu	Gly	Phe	Ala	Pro	Leu	Phe	Ser	Asn	Met	Phe	405	
	AGC	AAG	GTG	ACA	AGT	GCC	GGG	GAA	CTG	CTT	AGA	CCC	AAC	AGT	CAA	1260	
	Ser	Lys	Val	Thr	Ser	Ala	Gly	Glu	Leu	Leu	Arg	Pro	Asn	Ser	Gln	420	
	TTA	ATG	CGG	GAC	GTG	AGA	CAG	ATA	TAT	CCC	GAT	AAT	GAG	CAG	CGT	1305	
20	Leu	Met	Arg	Asp	Val	Arg	Gln	Ile	Tyr	Pro	Asp	Asn	Glu	Gln	Arg	435	
	CGC	TTA	AGC	GCC	ATT	ACT	GCA	CTT	GAG	TCC	ACT	GCA	TGG	TGC	GTC	1350	
	Arg	Leu	Ser	Ala	Ile	Thr	Ala	Leu	Glu	Ser	Thr	Ala	Trp	Cys	Val	450	
	AAA	GAA	GCG	CTA	GGG	GAT	CGG	CCG	GAA	TGT	ACT	CGT	CTA	CTC	AAA	1395	
25	Lys	Glu	Ala	Leu	Gly	Asp	Arg	Pro	Glu	Cys	Thr	Arg	Leu	Leu	Lys	465	
	TAT	AAA	ACG	GCG	TTC	GAA	TAC	GAT	CAA	TCT	CTC	CTA	ATA	GAT	TTA	1440	
	Tyr	Lys	Thr	Ala	Phe	Glu	Tyr	Asp	Gln	Ser	Leu	Leu	Ile	Asp	Leu	480	
	TGT	GCG	GAT	AGA	GCC	CCT	TTT	GTG	GAT	CAG	AGC	CAA	TCA	ATG	ACT	1485	
30	Cys	Ala	Asp	Arg	Ala	Pro	Phe	Val	Asp	Gln	Ser	Gln	Ser	Met	Thr	495	
	CTG	TTT	GTA	ACG	GAA	ACA	GCT	GAC	GGC	ACG	CTA	TTG	GCA	TCC	CGC	1530	
	Leu	Phe	Val	Thr	Glu	Thr	Ala	Asp	Gly	Thr	Leu	Leu	Ala	Ser	Arg	510	
	GTC	ATG	AAG	CTC	TTA	CAT	GCC	TAT	AAA	AGC	TGG	TCT	CAA	AAC	GGG	1575	
35	Val	Met	Lys	Leu	Leu	His	Ala	Tyr	Lys	Ser	Trp	Ser	Gln	Asn	Gly	525	
	AAT	GTA	CTA	TTG	CAA	GAT	CGC	AAG	GCT	ACG	AAT	ACT	GGC	ATA	TTT	1620	
	Asn	Val	Leu	Leu	Gln	Asp	Arg	Lys	Ala	Thr	Asn	Thr	Gly	Ile	Phe	540	
	AGC	GGC	GAC	GGA	GAA	CTG	ACC	TGT	TCT	TCC	TGC	GTG	TTG	TAATAAC		1666	
40	Ser	Gly	Asp	Gly	Glu	Leu	Thr	Cys	Ser	Ser	Cys	Val	Leu			553	
	CACCGTTTATTAACTCAATATAGCCGCCATG	AAC	AAC	CCA	GTG	CAT	GCT	GCC								1718	
									Met	Asn	Asn	Pro	Val	His	Ala	Ala	561
	GGG	AAT	CCG	CCG	AAC	AAT	TAT	TTT	TCT	TTA	GAT	GGG	ACC	GAT	CTT		1763
45	Gly	Asn	Pro	Pro	Asn	Asn	Tyr	Phe	Ser	Leu	Asp	Gly	Thr	Asp	Leu		576
	CAT	CTT	TCC	GAG	AGA	GGG	GCC	ACT	TCT	CCG	AAA	GGG	AGT	GAT	GGG		1808
	His	Leu	Ser	Glu	Arg	Gly	Ala	Thr	Ser	Pro	Lys	Gly	Ser	Asp	Gly		591
	GSA	GAC	CTA	GCC	TCT	CCG	TAC	GTG	AAC	AAT	TGC	CAT	ATC	ACA	ACG		1853
50	Gly	Asp	Leu	Ala	Ser	Pro	Tyr	Val	Asn	Asn	Cys	His	Ile	Thr	Thr		606
	GCG	CAA	TAT	TTC	TAC	GTT	CCG	GAA	TGC	CCT	GAT	ATA	GSA	AAC	CTA		1898
	Ala	Gln	Tyr	Phe	Tyr	Val	Pro	Glu	Cys	Pro	Asp	Ile	Gly	Asn	Leu		621
	CGA	TCT	TTG	AGC	ATC	ATG	AAC	CGG	TGG	ACC	GAA	ACG	GAA	TTC	GTA		1943
55	Arg	Ser	Leu	Ser	Ile	Met	Asn	Arg	Trp	Thr	Glu	Thr	Glu	Phe	Val		636
	ATT	GCA	GAC	GAC	CTC	GAG	GAT	GTC	GGC	AAG	CTT	AAG	AAT	GAA	AAA		1988

EP 0 447 303 B1

Ile Ala Asp Asp Leu Glu Asp Val Gly Lys Leu Lys Asn Glu Lys 651
AAT TTT TAT CGC TTT CTA TTT ACC TTT TTA TCC GCC GCC GAC GAT 2033
Asn Phe Tyr Arg Phe Leu Phe Thr Phe Leu Ser Ala Ala Asp Asp 660
5 CTA GTT AAC TTG AAT ATA GAC AGT CTG TTG AGT TTA TTC ACT CAG 2078
Leu Val Asn Leu Asn Ile Asp Ser Leu Leu Ser Leu Phe Thr Gln 681
AAA GAT ATA CAT CAT TAT TAC TTT GAA CAG GAA TGT ATA GAA GCT 2123
Lys Asp Ile His His Tyr Tyr Phe Glu Gln Glu Cys Ile Glu Ala 698
10 GTC CAT TCG AGG GCC TAC AGT ATA ATT CAG CTA ATG CTG TTC AGC 2168
Val His Ser Arg Ala Tyr Ser Ile Ile Gln Leu Met Leu Phe Ser 711
AAT GAT CAA GCC GCT CGC CAA GAA TAC GTC ACC TCA ACT TTG AGA 2213
Asn Asp Gln Ala Ala Arg Gln Glu Tyr Val Thr Ser Thr Leu Arg 726
15 TCC CCC GCA ATT TTA TCA AAA TTG GAA TGG TTG GAA CGG CGA GTT 2258
Ser Pro Ala Ile Leu Ser Lys Leu Glu Trp Leu Glu Arg Arg Val 741
GCA GAA TGC ACC TCT ATC GCT GAA AAA TAT ATT CTC ATG ATT TTA 2303
Ala Glu Cys Thr Ser Ile Ala Glu Lys Tyr Ile Leu Met Ile Leu 756
20 ATA GAG GGT ATA TTT TTC ACT GCG TCT TTT GCT GCA ATC GCC TAC 2348
Ile Glu Gly Ile Phe Phe Thr Ala Ser Phe Ala Ala Ile Ala Tyr 771
CTT CGT GTC AAT AAC CTG TTT GTG GTT ACA TGT CAA ATT AAC AAC 2393
Leu Arg Val Asn Asn Leu Phe Val Val Thr Cys Gln Ile Asn Asn 786
25 TTG ATT AGC AGA GAT GAA GCT ATA CAC GTG GAA GCA TCC TGT TGC 2438
Leu Ile Ser Arg Asp Glu Ala Ile His Val Glu Ala Ser Cys Cys 801
ATT TTT AAA AAT TAT CTC GCC GGC CCC AAA CCT ACT ACT GCC CGC 2483
Ile Phe Lys Asn Tyr Leu Ala Gly Pro Lys Pro Thr Thr Ala Arg 816
30 ATC CAC ACG CTG TTT AAA GAA GCC GTT ACG GTG GAA TGC GAG TTC 2528
Ile His Thr Leu Phe Lys Glu Ala Val Thr Val Glu Cys Glu Phe 831
CTC CGC ACG GCG GCT CCT CGC ACC AGT AAT ATT ATC AAT ATT GAT 2573
Leu Arg Thr Ala Ala Pro Arg Thr Ser Asn Ile Ile Asn Ile Asp 846
35 GCC ATT TGC AGC TAT GTA CGG TAC AGT GCA GAC AGG TTG TTG AGA 2618
Ala Ile Cys Ser Tyr Val Arg Tyr Ser Ala Asp Arg Leu Leu Arg 861
GCG CTT GAT ATA CTG CCC ATT TAC GAC GAA CCC AAA CCC CCT GCT 2663
Ala Leu Asp Ile Leu Pro Ile Tyr Asp Glu Pro Lys Pro Pro Ala 876
40 GAT TTC CCC CTC GTC CTC ATG TCC GCT GCA AGC AAT ACT AAC TTT 2708
Asp Phe Pro Leu Val Leu Met Ser Ala Ala Ser Asn Thr Asn Phe 891
TTC GAG CGA CGA AAC ACC GCA TAC TCT GGA AGC GTT TCA AAT GAT 2753
Phe Glu Arg Arg Asn Thr Ala Tyr Ser Gly Ser Val Ser Asn Asp 906
45 CTT TAATTCGCAATTGAAATTACCCGATTACGCTGTACTTTAGGTCAAATATAAAGTT 2811
Leu 907
CGTGTAAATGCATCCTCGTTGCGTTTTCTTTTTAGGCGACCCTATTCCAATACTTTGTCA 2871
50 ACCACTCTATTGAAGGCGTATCTCGATGCGTGGTAAAAAGCGGATGCTAAACTGCCCGCT 2931
TCGTTACTATCAACTATACTACGGAGGACCAAGTTCTCAATTGCAGAAATCATCCCGCGTC 2991
TCTTGCGTAATAGGAAACCGCTTTAAGATACTGACTCTGTGTGTTCTTCGTTCTGGTGT 3051
55 ATATTTTCTATTACATGTTTTATAAATTTATATTCTAGAACTTCACATTTGGTTCGGTGG 3111

AGCTCGTAAATGCGTTAACGCGCTGCCGTGCGTCGCGTATTATATTTACATCGTTATAGST 3171
5 GGCGCACAGGCGGTCTGTGCTGGAGTTATGATCATTTTTGCGGTTCTCGCTTAAAGTTGT 3231
CCGTAGATTATGCTTCAGTCCAGACCTATCTATATGCTTCTCGTTTA 3278

10

SEQ ID NO: 2

15

Longueur de la séquence : 2 176 paires de bases
Type de molécule séquencée : ADNc pour ARN génomique
Origine de la molécule :

20

Virus de la maladie de Newcastle
souche Texas

Source expérimentale :
Plasmide pNDV 108

Caractéristiques :

25

de 1 à 271 paires de bases : gène Matrix
de 272 à 430 paires de bases : région non codante
de 431 à 2 092 paires de bases : gène de la protéine fusion
de 2 093 à 2 176 paires de bases : région non codante

30

35

40

45

50

55

	A	CCT	TCC	GTG	CTC	GTG	AAG	GCG	AGA	GGT	GCA	CGG	ACT	AGG	CTG	43	
		Pro	Ser	Val	Leu	Val	Lys	Ala	Arg	Gly	Ala	Arg	Thr	Arg	Leu	14	
5		CTG	GCA	CCT	TTC	TTC	TCT	AGC	AGT	GGG	ACA	GCC	TGC	TAT	CCT	ATA	86
		Leu	Ala	Pro	Phe	Phe	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Ala	Cys	Tyr	Pro	Ile	29
		GCA	AAT	GCC	TCT	CCT	CAG	GTA	GCT	AAG	ATA	CTC	TGG	AGT	CAA	ACT	133
		Ala	Asn	Ala	Ser	Pro	Gln	Val	Ala	Lys	Ile	Leu	Trp	Ser	Gln	Thr	44
10		GCG	CGC	CTG	CGG	AGT	GTA	AAA	ATC	ATC	ATT	CAA	GCG	GGC	ACC	CAA	178
		Ala	Arg	Leu	Arg	Ser	Val	Lys	Ile	Ile	Ile	Gln	Ala	Gly	Thr	Gln	59
		CGC	GCT	GTC	GCA	GTG	ACT	GCT	GAC	CAT	GAG	GTT	ACC	TCT	ACT	AAG	223
		Arg	Ala	Val	Ala	Val	Thr	Ala	Asp	His	Glu	Val	Thr	Ser	Thr	Lys	74
15		ATA	GAG	AAG	AGG	CAT	ACC	ATT	GCT	AAA	TAC	AAT	CCT	TTC	AAG	AAA	268
		Ile	Glu	Lys	Arg	His	Thr	Ile	Ala	Lys	Tyr	Asn	Pro	Phe	Lys	Lys	89
		TAGGCTGCATCTCTGAGACTGCAATCCGCCCGCTTTCCCGAATCACCATGATACTAGATA	328														
20		ATGATCTGTCTTGATTGCTTACAGTTAGTTTACCTGTCTATCAAGTTAGAAAAACACGG	388														
		GTAGAAGAATTTGGATCCCGGTTGGCACATTCAAGGTGCAAGATG GGC TCC AGA	442														
			Met	Gly	Ser	Arg											93
25		TCT	TCT	ACC	AGG	ATC	CCG	GTA	CCT	CTA	ATG	CTG	ATC	ATC	CGA	ACC	487
		Ser	Ser	Thr	Arg	Ile	Pro	Val	Pro	Leu	Met	Leu	Ile	Ile	Arg	Thr	108
		GCG	CTG	ACA	CTG	AGC	TGT	ATC	CGT	CTG	ACA	AGC	TCT	CTT	GAT	GGC	532
		Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Cys	Ile	Arg	Leu	Thr	Ser	Ser	Leu	Asp	Gly	123
30		AGG	CCT	CTT	GCG	GCT	GCA	GGG	ATC	GTG	GTA	ACA	GGA	GAT	AAA	GCA	577
		Arg	Pro	Leu	Ala	Ala	Ala	Gly	Ile	Val	Val	Thr	Gly	Asp	Lys	Ala	138
		GTC	AAC	ATA	TAC	ACC	TCA	TCC	CAG	ACA	GGG	TCA	ATC	ATA	GTT	AAG	622
		Val	Asn	Ile	Tyr	Thr	Ser	Ser	Gln	Thr	Gly	Ser	Ile	Ile	Val	Lys	153
35		TTA	CTC	CCG	AAT	ATG	CCC	AAG	GAC	AAA	GAG	GTG	TGT	GCA	AAA	GCC	667
		Leu	Leu	Pro	Asn	Met	Pro	Lys	Asp	Lys	Glu	Val	Cys	Ala	Lys	Ala	168
		CCA	TTG	GAG	GCA	TAC	AAC	AGG	ACA	CTG	ACT	ACT	TTA	CTC	ACC	CCC	712
		Pro	Leu	Glu	Ala	Tyr	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Thr	Pro	183
40		CTT	GGT	GAT	TCT	ATC	CGC	AGG	ATA	CAA	GAG	TCT	GTG	ACT	ACT	TCC	757
		Leu	Gly	Asp	Ser	Ile	Arg	Arg	Ile	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Thr	Ser	198
		G... GGA	AGG	AGA	CAG	AGA	CGC	TTT	ATA	GGT	GCC	ATT	ATC	GGC	AGT		802
		Gly	Gly	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Phe	Ile	Gly	Ala	Ile	Ile	Gly	Ser	213
45		GTA	GCT	CTT	GGG	GTT	GCG	ACA	GCT	GCA	CAG	ATA	ACA	GCA	GCT	TGG	847
		Val	Ala	Leu	Gly	Val	Ala	Thr	Ala	Ala	Gln	Ile	Thr	Ala	Ala	Ser	228
		GCC	CTG	ATA	CAA	GCC	AAC	CAG	AAT	GCT	GCC	AAC	ATC	CTC	CGG	CTT	892
		Ala	Leu	Ile	Gln	Ala	Asn	Gln	Asn	Ala	Ala	Asn	Ile	Leu	Arg	Leu	243
50		AAA	GAG	AGC	ATT	GCT	GCA	ACC	AAT	GAA	GCT	GTG	CAC	GAG	GTC	ACT	937
		Lys	Glu	Ser	Ile	Ala	Ala	Thr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Glu	Val	Thr	258
		GAC	GGA	TTA	TCA	CAA	CTA	GCA	GTG	GCA	GTA	GGG	AAG	ATG	CAA	CAG	982
		Asp	Gly	Leu	Ser	Gln	Leu	Ala	Val	Ala	Val	Gly	Lys	Met	Gln	Gln	273
55		TTT	GTC	AAT	GAC	CAG	TTC	AAT	AAT	ACA	GCG	CAA	GAA	TTG	GAC	TGT	1027
		Phe	Val	Asn	Asp	Gln	Phe	Asn	Asn	Thr	Ala	Gln	Glu	Leu	Asp	Cys	288

EP 0 447 303 B1

	ATA AAA ATT GCA CAG CAG GTC GGT GTA GAA CTC AAC TTG TAC CTA	1072
	Ile Lys Ile Ala Gln Gln Val Gly Val Glu Leu Asn Leu Tyr Leu	303
5	ACT GAA TTG ACT ACA GTA TTT GGG GCA CAA ATC ACT TCC CCT GGC	1117
	Thr Glu Leu Thr Thr Val Phe Gly Pro Gln Ile Thr Ser Pro Ala	315
	TTA ACT CAG CTG ACT ATC CAA GGG CTT TAC AAT CTA GCT GGT GGT	1162
	Leu Thr Gln Leu Thr Ile Gln Ala Leu Tyr Asn Leu Ala Gly Gly	333
10	AAT ATG SAT TAC TTG CTG ACT AAG TTA GGT GTA GGG AAC AAC CAA	1207
	Asn Met Asp Tyr Leu Leu Thr Lys Leu Gly Val Gly Asn Asn Gln	348
	CTC AGC TCA TTA ATT GGT AGC GGC TTG ATC ACC GGC AAC CCT ATT	1252
	Leu Ser Ser Leu Ile Gly Ser Gly Leu Ile Thr Gly Asn Pro Ile	363
15	CTG TAC GAC TCA CAG ACT CAG ATC TTG GGT ATA CAG GTA ACT TTG	1297
	Leu Tyr Asp Ser Gln Thr Gln Ile Leu Gly Ile Gln Val Thr Leu	378
	CCT TCA GTT GGG AAC CTG AAT AAT ATG CGT GCC ACC TAC CTG GAG	1342
	Pro Ser Val Gly Asn Leu Asn Asn Met Arg Ala Thr Tyr Leu Glu	393
20	ACC TTA TCT GTA AGC ACA ACC AAG GGA TTT GGC TCA GCA CTT GTC	1387
	Thr Leu Ser Val Ser Thr Thr Lys Gly Phe Ala Ser Ala Leu Val	408
	CCA AAA GTG GTG ACA CAG GTC GGT TCC GTG ATA GAA GAA CTT GAC	1432
	Pro Lys Val Val Thr Gln Val Gly Ser Val Ile Glu Glu Leu Asp	423
25	ACC TCA TAC TGT ATA GGG ACC GAC TTG GAT TTA TAC TGT ACA AGA	1477
	Thr Ser Tyr Cys Ile Gly Thr Asp Leu Asp Leu Tyr Cys Thr Arg	438
	ATA GTG ACA TTC CCT ATG TCT CCT GGT ATT TAT TCT TGT CTG AGC	1522
	Ile Val Thr Phe Pro Met Ser Pro Gly Ile Tyr Ser Cys Leu Ser	453
30	GGT AAT ACA TCG GCT TGC ATG TAT TCA AAG ACT GAA GGC GCA CTT	1567
	Gly Asn Thr Ser Ala Cys Met Tyr Ser Lys Thr Glu Gly Ala Leu	468
	ACT ACG CCA TAT ATG GCT CTC AAA GGC TCA GTT ATT GGC AAT TGC	1612
	Thr Thr Pro Tyr Met Ala Leu Lys Gly Ser Val Ile Ala Asn Cys	483
35	AAG CTG ACA ACA TGT AGA TGT GCA GAT CCC CCA GGT ATC ATA TCG	1657
	Lys Leu Thr Thr Cys Arg Cys Ala Asp Pro Pro Gly Ile Ile Ser	498
	CAA AAT TAT GGA GAA GCT GTG TCC TTA ATA GAT AGG CAC TCA TGC	1702
	Gln Asn Tyr Gly Glu Ala Val Ser Leu Ile Asp Arg His Ser Cys	513
40	AAC GTC TTA TCC TTA GAC GGG ATA ACT CTG AGG CTC AGT GGG GAA	1747
	Asn Val Leu Ser Leu Asp Gly Ile Thr Leu Arg Leu Ser Gly Glu	528
	TTT GAT GCA ACC TAT CAA AAG AAT ATC TCT ATA CTA GAT TCT CAA	1792
	Phe Asp Ala Thr Tyr Gln Lys Asn Ile Ser Ile Leu Asp Ser Gln	543
45	GTT ATA GTG ACA GGC AAT CTT GAT ATA TCA ACT GAG CTT GGG AAT	1837
	Val Ile Val Thr Gly Asn Leu Asp Ile Ser Thr Glu Leu Gly Asn	558
	GTC AAC AAC TCA ATA AGT AAT GCC CTG AAT AAG TTA GAG GAA AGC	1882
	Val Asn Asn Ser Ile Ser Asn Ala Leu Asn Lys Leu Glu Glu Ser	573
50	AAC AGC AAA CTA GAC AAA GTC AAT GTC AAA CTG ACC AGC ACA TCT	1927
	Asn Ser Lys Leu Asp Lys Val Asn Val Lys Leu Thr Ser Thr Ser	588
	GCT CTC ATT ACC TAC ATC GTT TTA ACT GTC ATA TCT CTT GTT TTT	1972
	Ala Leu Ile Thr Tyr Ile Val Leu Thr Val Ile Ser Leu Val Phe	603
55	GGT GTA CTT AGC CTG GTT CTA GCA TGC TAC CTG ATG TAC AAG CAA	2017
	Gly Val Leu Ser Leu Val Leu Ala Cys Tyr Leu Met Tyr Lys Gln	618

AAG GCA CAA CAA AAG ACC TTG TTA TGG CTT GGG AAT AAT ACC CTT 2082
 Lys Ala Gln Gln Lys Thr Leu Leu Trp Leu Gly Asn Asn Thr Leu 633
 5 GAT CAG ATG AGA GCC ACT ACA AAA ATA TGAATACAAACGAGAGGCGGAGG 2112
 Asp Gln Met Arg Ala Thr Thr Lys Ile 642
 TATCCCCAATAGCAATTTGCGTGTAATTCTGGCAACCTGTTAATTAGAAGAATTAAGAA 2172
 10 AAAAA

SEQ ID NO: 3

15 TYPE DE SEQUENCE : oligonucléotide
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 21 bases
 TYPE DE MOLECULE : ADN

5' GCAGCATGCCCCGGGTTGTTG 3'
 SmaI

SEQ ID NO: 4

25 TYPE DE SEQUENCE : oligonucléotide
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 21 bases
 TYPE DE MOLECULE : ADN

5' CCGATTACGTCGACTTTAGG 3'
 SalI

SEQ ID NO: 5

35 TYPE DE SEQUENCE : oligonucléotide
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 21 bases
 TYPE DE MOLECULE : ADN

5' GGGTTGTCCATGGCGGCTATA 3'
 NcoI

SEQ ID NO: 6

45 TYPE DE SEQUENCE : oligonucléotide
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 22 bases
 TYPE DE MOLECULE : ADN

5' CAAGGTGCACCATGGGCTCCAG 3'
 NcoI

SEQ ID NO: 7

55 TYPE DE SEQUENCE : oligonucléotide
 LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 25 bases
 TYPE DE MOLECULE : ADN

5' GCTATTGGGGATATCTCCGCCTCTC 3'

EcoRV

5

Revendications

- 10 1. Virus recombinant HVT, comprenant au moins un gène hétérologue inséré dans la région, du génome dudit virus, correspondant au gène de la petite sous-unité RR2 de la ribonucléotide réductase, de façon à pouvoir être exprimé.
2. Virus recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le gène hétérologue code pour un immunogène viral, bactérien ou parasitaire.
- 15 3. Virus recombinant HVT, comprenant au moins un gène hétérologue qui est inséré dans la région, du génome de HVT, correspondant au gène de la petite sous-unité RR2 de la ribonucléotide réductase et qui code pour des immunogènes provenant d'agents pathogènes associés notamment à la maladie de Marek, à la bronchite infectieuse aviaire, à la maladie de Newcastle, à la peste aviaire, à la maladie de Gumboro, à la laryngotrachéite infectieuse, à la coccidiose, à la colibacillose.
- 20 4. Virus recombinant selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en ce que le gène hétérologue inséré est susceptible d'être exprimé sous le contrôle des séquences régulatrices de la transcription du gène de la petite sous-unité RR2.
- 25 5. Virus recombinant selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en ce que le gène hétérologue inséré est susceptible d'être exprimé sous la dépendance de séquences promotrices, du virus considéré ou d'autres virus herpès, rapportées dans le génome du virus considéré.
- 30 6. Virus recombinant selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que les codons d'initiation et de terminaison du gène RR2 sont remplacés par ceux du gène à insérer.
- 35 7. Procédé de préparation d'un virus recombinant à partir d'un virus HVT, caractérisé en ce qu'on insère au moins un gène hétérologue dans la région, du génome dudit virus, qui correspond au gène de la petite sous-unité RR2 de la ribonucléotide réductase, de telle façon que ledit gène hétérologue puisse être exprimé.
- 40 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'on isole une partie du génome viral renfermant le gène de la petite sous-unité RR2, on réalise une délétion partielle ou totale de ce gène et on insère le gène hétérologue dans la région correspondant audit gène avant d'insérer la séquence ADN obtenue dans le génome du virus par cotransfection et recombinaison homologe.
- 45 9. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que le gène inséré est sous le contrôle de séquences régulatrices de la transcription du gène RR2.
- 50 10. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que le gène inséré est sous la dépendance de séquences promotrices, du virus considéré ou d'autres virus herpès, rapportées dans le génome du virus considéré.
- 55 11. Procédé selon l'une des revendications 7 à 10, caractérisé en ce que l'on substitue les codons d'initiation et de terminaison du gène RR2 par ceux du gène à insérer.
12. Procédé de préparation d'un virus recombinant HVT, caractérisé en ce que :
 - a) on isole un fragment Bam HI K1 du génome de HVT par digestion du génome par l'enzyme de restriction Bam HI
 - b) on digère ce fragment par l'enzyme de restriction Hind III, pour obtenir un fragment correspondant à la partie 5' du gène RR2 et à la région en amont incluant le promoteur et un fragment correspondant à la partie 3' du gène RR2 et à la région en aval de ce gène,
 - c) on clone les deux fragments 5' et 3' obtenus en b) respectivement dans les vecteurs pUC18 et pUC19,
 - d) on digère ces plasmides respectivement par les couples d'enzymes de restriction Hind III - Aat II et Xmn I - Aat II puis on les lie ensemble pour donner un nouveau plasmide comportant une délétion entre les sites

initiaux Hind III et Xmn I,

e) on crée par mutagenèse dirigée les sites de restriction dans le plasmide obtenu en d),

f) on clone dans ce site de restriction un gène hétérologue, et

g) on insère le fragment d'ADN obtenu en f) dans le génome du virus HVT par cotransfection et recombinaison homologue.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le gène hétérologue code pour un immunogène provenant d'agents pathogènes associés à une maladie aviaire telle que la maladie de Marek, la bronchite infectieuse aviaire, la maladie de Newcastle, la peste aviaire, la maladie de Gumboro, la laryngotrachéite infectieuse, la coccidiose, la colibacillose.

14. Virus recombinant obtenu selon l'une quelconque des revendications 7 à 13.

15. Vaccin comprenant un virus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 et 14.

16. Séquence nucléotidique délimitée par les bases 1695 à 2759 à la SEQ ID NO : 1, et ses variantes et fragments, et correspondant au gène de la petite sous-unité RR2 de la ribonucléotide réductase du virus HVT.

Patentansprüche

1. Rekombinantes HVT-Virus, enthaltend mindestens ein heterologes Gen, das in den Bereich des Genoms des genannten Virus, der dem Gen der kleinen Untereinheit RR2 der Ribonucleotid-Reduktase entspricht, in der Weise eingefügt ist, daß es exprimiert werden kann.

2. Rekombinantes Virus nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das heterologe Gen für ein virales, bakterielles oder parasitäres Immunogen codiert.

3. Rekombinantes HVT-Virus, enthaltend mindestens ein heterologes Gen, welches in den Bereich des HVT-Genoms, der dem Gen der kleinen Untereinheit RR2 der Ribonucleotid-Reduktase entspricht, eingefügt ist und für Immunogene codiert, die von pathogenen Mitteln abstammen, welche insbesondere mit der Marek-Krankheit, der infektiösen Vogel-Bronchitis, der Newcastle-Krankheit, der Vogel-Pest, der Gumboro-Krankheit, der infektiösen Laryngotracheitis, der Kokzidiose und der Colibacillose verknüpft ist.

4. Rekombinantes Virus nach Anspruch 2 oder 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das eingefügte heterologe Gen unter der Steuerung von regulierenden Sequenzen der Transkription des Gens der kleinen Untereinheit RR2 exprimiert werden kann.

5. Rekombinantes Virus nach Anspruch 2 oder 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das eingefügte heterologe Gen in Abhängigkeit von fördernden Sequenzen des in Rede stehenden Virus oder anderer Herpesviren, die in dem Genom des in Rede stehenden Virus eingebracht sind, exprimiert werden kann.

6. Rekombinantes Virus nach einem der Ansprüche 2 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Start- und Stop-Codons des Gens RR2 durch jene des einzufügenden Gens ersetzt sind.

7. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Virus ausgehend von einem HVT-Virus, **dadurch gekennzeichnet**, daß man mindestens ein heterologes Gen in den Bereich des Genoms des genannten Virus, der dem Gen der kleinen Untereinheit RR2 der Ribonucleotid-Reduktase entspricht, in der Weise einfügt, daß das heterologe Gen exprimiert werden kann.

8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß man einen Teil des viralen Genoms, der das Gen der kleinen Untereinheit RR2 enthält, isoliert, eine teilweise oder vollständige Deletion dieses Gens bewirkt und das heterologe Gen in den dem genannten Gen entsprechenden Bereich einfügt, bevor man die erhaltenen DNA-Sequenz durch Co-Transfektion und homologe Rekombination in das Genom des Virus einfügt.

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß das eingefügte Gen unter der Steuerung von regulierenden Sequenzen der Transkription des Gens RR2 steht.

10. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß das eingefügte Gen unter Abhängigkeit von fördernden Sequenzen des in Rede stehenden Virus oder anderer Herpes-Viren, die in dem Genom des in Rede stehenden Virus vorliegen, steht.
- 5 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Start- und Stop-Codons des Gens RR2 durch jene des einzufügenden Gens ersetzt.
12. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten HVT-Virus, **dadurch gekennzeichnet**, daß man:
- 10 a) ein Fragment Bam HI K1 des HVT-Genoms durch Digerieren des Genoms mit dem Restriktionsenzym Bam HI isoliert,
b) dieses Fragment mit dem Restriktionsenzym Hind III digeriert, um ein Fragment, das dem 5'-Abschnitt des Gens RR2 und dem oberhalb davon liegenden Bereich einschließlich des Promotors entspricht, und ein Fragment, das dem 3'-Abschnitt des Gens RR2 und dem unterhalb davon liegenden Bereich dieses Gens entspricht, zu erhalten,
15 c) die beiden in der Stufe b) erhaltenen Fragmente 5' und 3' in den Vektoren pUC18 bzw. pUC19 kloniert.
d) diese Plasmide mit den Restriktionsenzympaaren Hind III - Aat II bzw. Xmn I - Aat II digeriert und sie anschließend verknüpft zur Bildung eines neuen Plasmids, welches eine Deletion zwischen den Ursprungsstellen Hind III und Xmn I aufweist,
20 e) durch gesteuerte Mutagenese Restriktionsstellen in dem in der Stufe d) erhaltenen Plasmid erzeugt,
f) in dieser Restriktionsstelle ein heterologes Gen kloniert und
g) das in der Stufe f) erhaltene DNA-Fragment durch Co-Transfektion und homologe Rekombination in das Genom des HVT-Virus einfügt.
- 25 13. Verfahren nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß das heterologe Gen für ein Immunogen codiert, das von pathogenen Mitteln stammt, die mit einer Vogel-Krankheit, wie der Marek-Krankheit, der infektiösen Vogel-bronchitis, der Newcastle-Krankheit, der Vogel-Pest, der Gumboro-Krankheit, der infektiösen Laryngotracheitis, der Kokzidiose und der Colibazillose, verknüpft sind.
- 30 14. Rekombinantes Virus, erhalten nach einem der Ansprüche 7 bis 13.
15. Impfstoff, enthaltend ein rekombinantes Virus nach einem der Ansprüche 1 bis 6 und 14.
- 35 16. Nucleotidsequenz, begrenzt durch die Basen 1695 bis 2759 der SEQ ID No: 1 und dessen Varianten und Fragmente, entsprechend dem Gen der kleinen Untereinheit RR2 der Ribonucleotid-Reduktase des HVT-Virus.

Claims

- 40 1. Recombinant HVT virus, comprising at least one heterologous gene inserted into the region of the genome of the said virus corresponding to the gene of the small sub-unit RR2 of the reductase ribonucleotide, in such a way as to be capable of being expressed.
- 45 2. Recombinant virus as claimed in Claim 1, characterised in that the heterologous gene codes for a viral, bacterial or parasitic immunogen.
- 50 3. Recombinant HVT virus, comprising at least one heterologous gene which is inserted in to the region of the HVT genome corresponding to the gene of the small sub-unit RR2 of the reductase ribonucleotide and which codes for immunogens originating from pathogenic agents associated particularly with Marek's disease, infectious bronchitis in fowl, Newcastle disease, fowlpest, Gumboro disease, infectious laryngotracheitis, coccidiosis, colibacillosis.
- 55 4. Recombinant virus as claimed in Claim 2 or 3, characterised in that the inserted heterologous gene is capable of being expressed under the control of the regulatory sequences of the transcription of the gene of the small sub-unit RR2.
5. Recombinant virus as claimed in Claim 2 or 3, characterised in that the inserted heterologous gene is capable of being expressed dependent upon promoting sequences of the virus concerned or of other herpes viruses put in the genome of the virus concerned.

6. Recombinant virus as claimed in one of Claims 2 to 5, characterised in that the codons for initiation and termination of the gene RR2 are replaced by those of the gene to be inserted.
- 5 7. Method of preparing a recombinant virus from a HVT virus, characterised in that at least one heterologous gene is inserted in the region of the genome of the said virus which corresponds to the gene of the small sub-unit RR2 of the reductase ribonucleotide, in such a way that the said heterologous gene can be expressed.
8. Method as claimed in Claim 7, characterised in that a part of the viral genome including the small sub-unit RR2 is isolated, a partial or total deletion of this gene is carried out and the heterologous gene is inserted in the region
10 corresponding to the said gene before the DNA sequence obtained is inserted in the genome of the virus by cotransfection and homologous recombination.
9. Method as claimed in Claim 7 or 8, characterised in that the inserted gene is under the control of regulatory sequences of the transcription of the gene RR2.
15
10. Method as claimed in Claim 7 or 8, characterised in that the inserted gene is dependent upon promoting sequences of the virus concerned or of other herpes viruses put in the genome of the virus concerned.
11. Method as claimed in one of Claims 7 to 10, characterised in that the codons for initiation and termination of the
20 gene RR2 are substituted by those of the gene to be inserted.
12. Method of preparing a recombinant HVT virus, characterised in that:
25
 - a) a fragment Bam HI K1 of the HVT genome is isolated by digestion of the genome by the restricting enzyme Bam HI.
 - b) this fragment is digested by the restricting enzyme Hind III in order to obtain a fragment corresponding to the part 5' of the gene RR2 and to the region upstream including the promoter and a fragment corresponding to the part 3' of the gene RR2 and to the region downstream of this gene,
30
 - c) the two fragments 5' and 3' obtained in b) are cloned respectively in the vectors pUC18 and pUC19.
 - d) these plasmides are digested respectively by the pairs of restricting enzymes Hind III - Aat II and Xmn I - Aat II, then they are bonded together to give a new plasmide having a deletion between the initial sites Hind
35 III and Xmn I,
 - e) restriction sites are created by directed mutagenesis in the plasmide obtained in d),
 - f) a heterologous gene is cloned in this restriction site, and
40
 - g) the DNA fragment obtained in f) is inserted in the genome of the HVT virus by cotransfection and homologous recombination.
13. Method as claimed in Claim 12, characterised in that the heterologous gene codes for an immunogen originating
45 from pathogenic agents associated with a disease of fowl such as Marek's disease, infectious bronchitis in fowl, Newcastle disease, fowlpest, Gumboro disease, infectious laryngotracheitis, coccidiosis, colibacillosis.
14. Recombinant virus obtained according to any one of Claims 7 to 13.
- 50 15. Vaccine comprising a recombinant virus according to any one of Claims 1 to 6 and 14.
16. Nucleotide sequence delimited by the bases 1695 to 2759 in SEQ ID NO: 1, and variants and fragments thereof, and corresponding to the gene of the small sub-unit RR2 of the reductase ribonucleotide of the HVT virus.

55

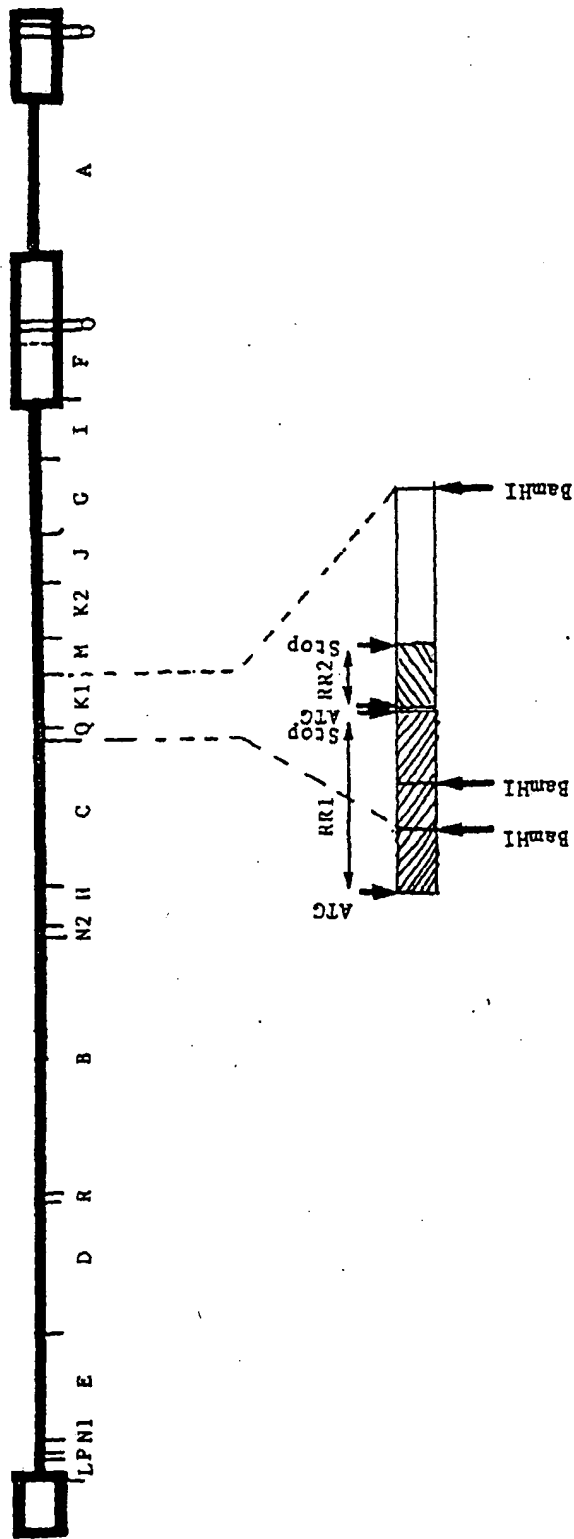


Figure 1

Carte de restriction du génome du virus HIVT et localisation du gène de la ribonucléotidase réductase

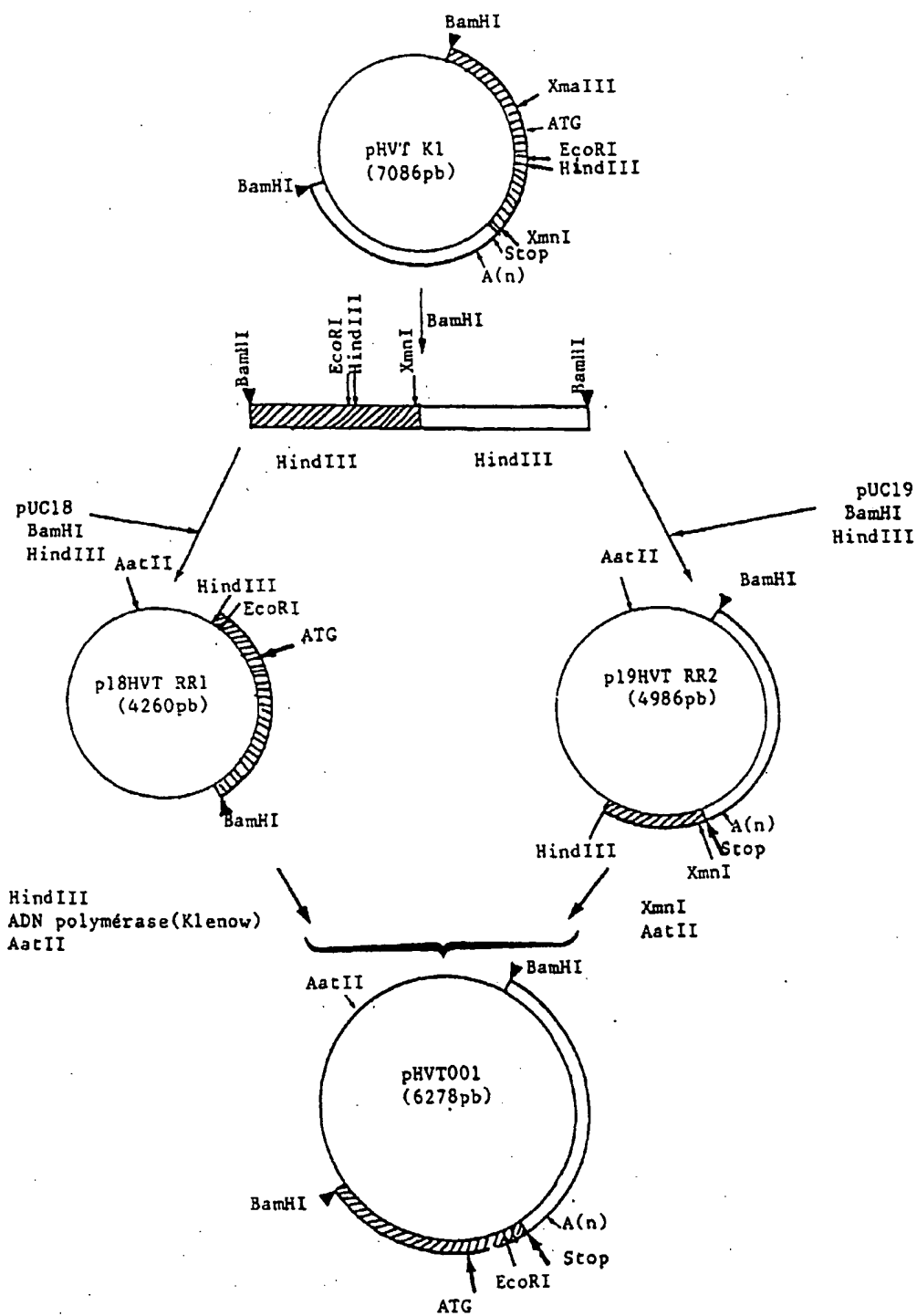


Figure 2

Introduction d'une délétion dans le gène de la petite sous unité RR2 de la ribonucléotide réductase

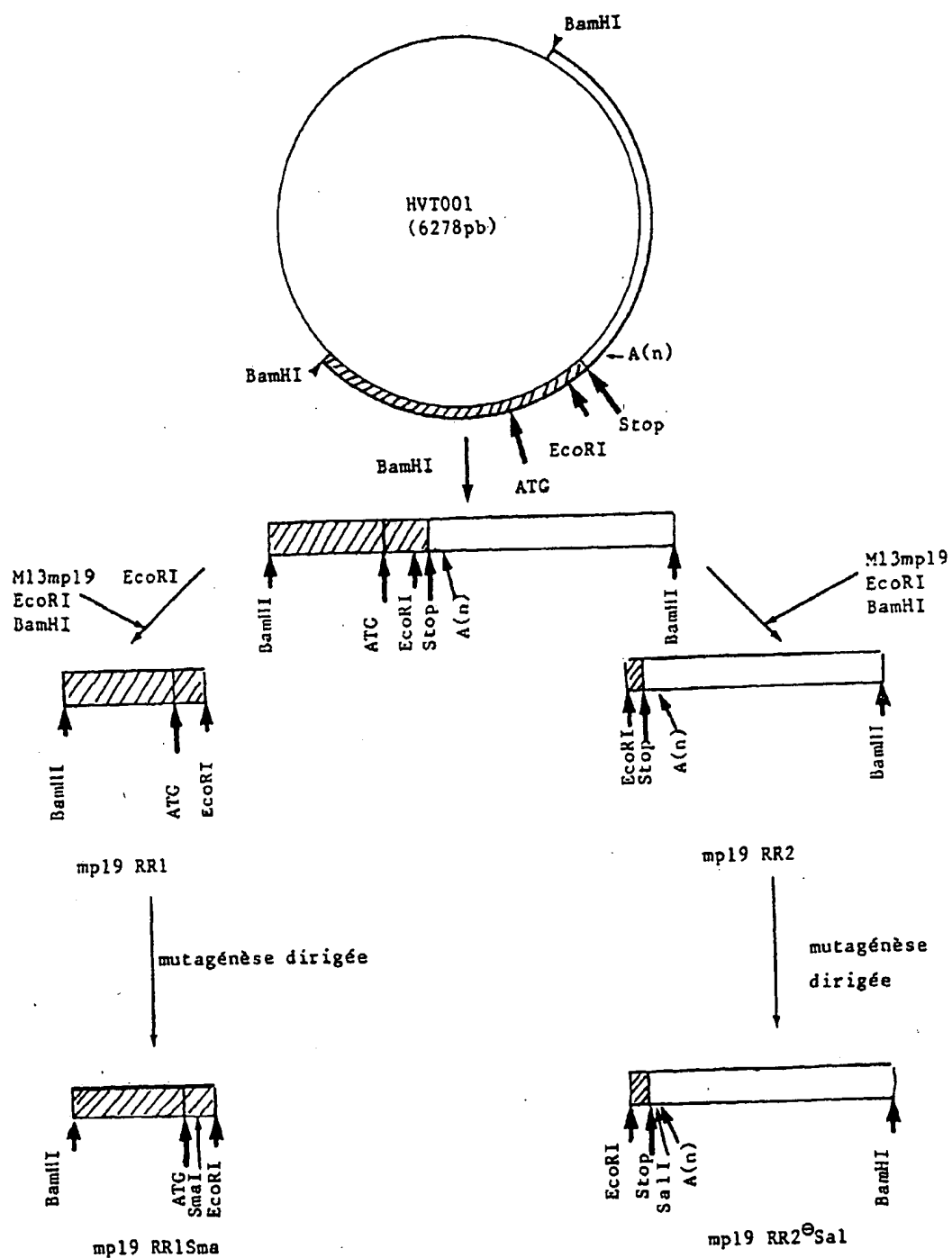


Figure 3

Création de sites de clonage par mutagenèse dirigée

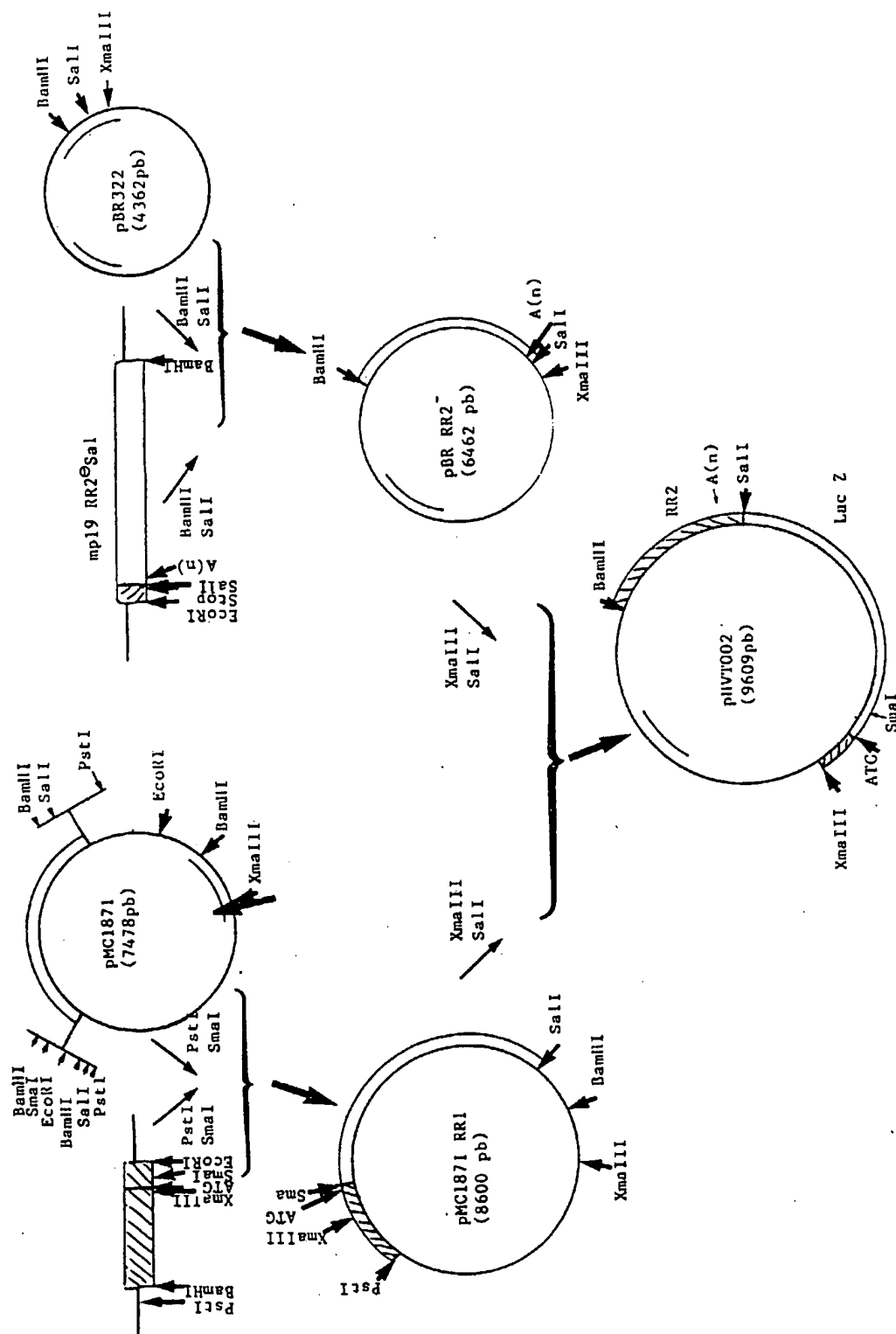


Figure 4 Insertion du gène Lac Z à la place du gène codant pour la petite sous unité RR2 de la ribonucleotide réductase

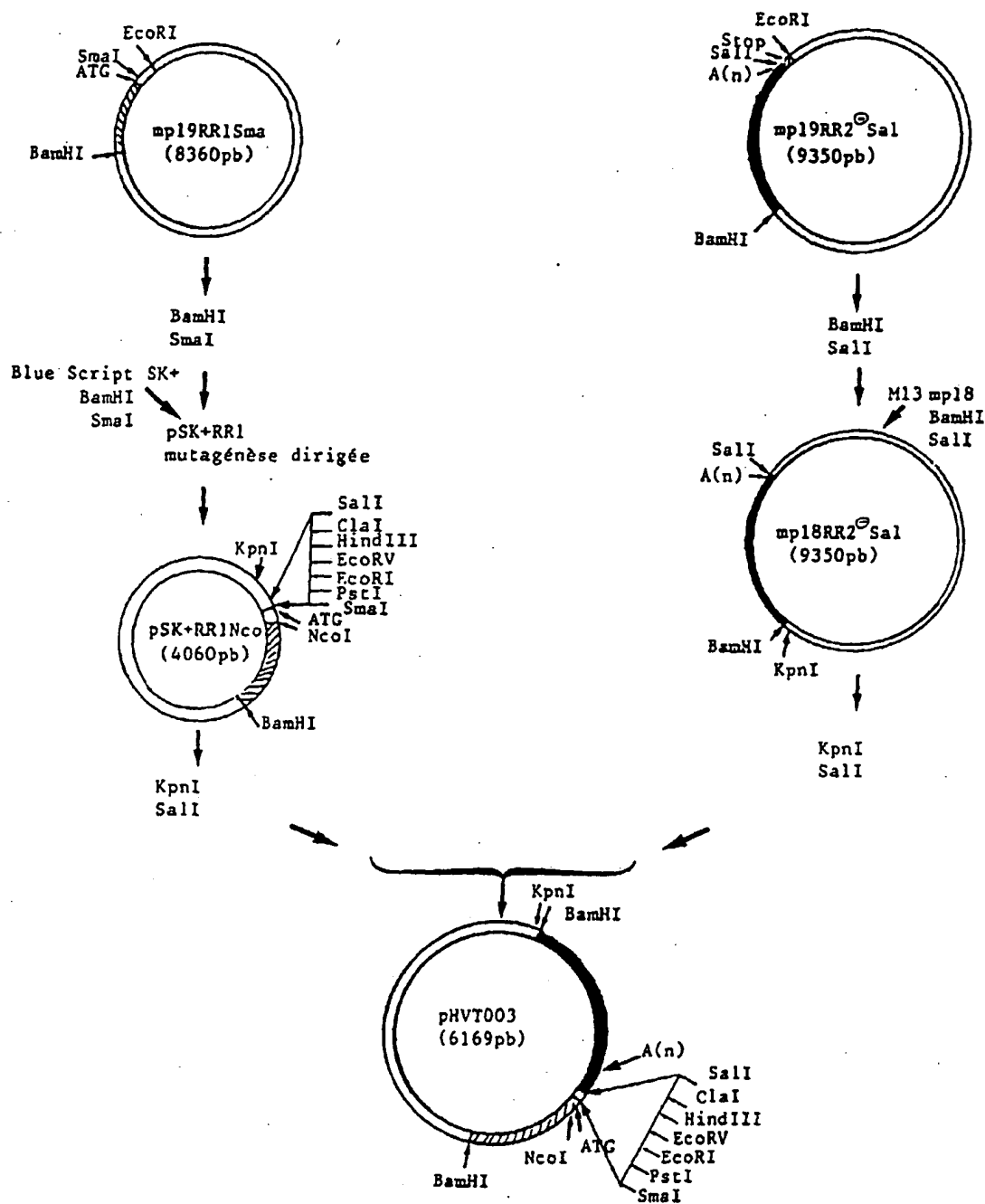


Figure 5

Construction du plasmide pHVT003

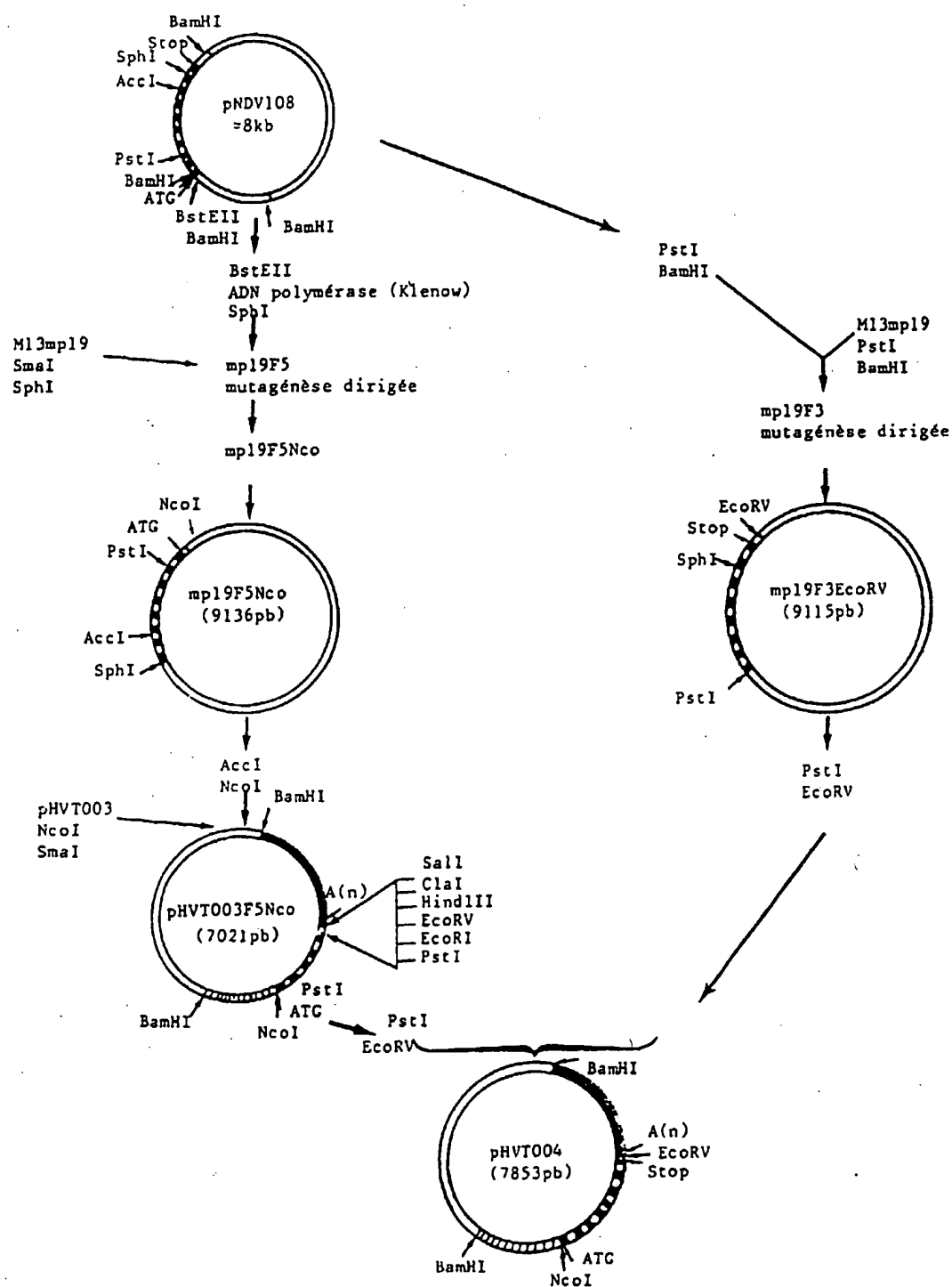


Figure 6

Construction du plasmide pHVT004